

TESIS DOCTORAL

**UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS
EN EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR AGUDA**

Maite Mendioroz Iriarte

Directores: Dr. Joan Montaner Vilallonga

Dr. Israel Fernández-Cadenas

Dr. José Álvarez-Sabín

DEPARTAMENT DE MEDICINA. FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Barcelona, 2010

Esta tesis ha sido realizada en parte gracias a la financiación del Instituto Carlos III (beca para la formación en investigación) y al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) FI05/00081. Los experimentos se han llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación Neurovascular (LIN) (Institut de Recerca) del Hospital Vall d'Hebron. El LIN forma parte de la red de investigación para el ictus RENEVAS (RD06/0026/0010) y de la European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213). Algunos de los estudios han sido financiados parcialmente por becas procedentes de Biosite Inc y del FIS (FIS 05/322, FIS 06/0586, FIS PI08/361).

“Ves cosas y dices, ¿por qué? pero yo sueño cosas que nunca fueron y digo, ¿por qué no?”

George Bernard Shaw (1856-1950)

AGRADECIMIENTOS

El esfuerzo de escribir una tesis puede parecer enorme pero se hace más llevadero si estás rodeada de personas que te quieren y que saben demostrártelo. Gracias a todos los que habéis estado a mi lado durante este tiempo y, con paciencia y cariño, me habéis llevado en volandas hasta el día de hoy.

En primer lugar quiero dar las gracias a Joan Montaner, por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Investigación Neurovascular durante estos años, él me ha confiado importantes retos y me ha contagiado su pasión por los biomarcadores. A Israel, por introducirme en el mundo de los SNPs y acompañarme en las excursiones GRECOS, entre otras muchas cosas, algún día te cambiarás a g-mail. A Pilar, compañera de batallas en las consultas hospitalarias y gran maestra de la exactitud científica.

A mis compañeros del grupo de genética; a Alberto, que siempre me hace ver las cosas un punto más allá y persiste en su lucha contra los GOMs; y a Sophie, que es una crack. Al resto de mis compañeros de la Unidad Neurovascular y del Lab de arriba, con los que he compartido tantas y tantas reuniones; gracias también a Laura y Anita, que me asistieron en mis primeras alícuotas allá por mis, ya lejanos, comienzos. Especialmente quiero dar las gracias a mis compañeras del “zulo”, Dolors, Cristina, Jessy y Laura, las que día a día me hacen reír y, al mismo tiempo, me ayudan a concentrarme en mi burbuja. Es una suerte enorme que nos hayamos encontrado y tendremos que celebrarlo con un tiramisú.

Decía William Osler que la medicina es la ciencia de la incertidumbre y el arte de la probabilidad, pero no podemos olvidar que los pacientes son de carne y hueso y que no hay nada más concreto que su sufrimiento. Aliviar ese sufrimiento debería ser el objetivo último de nuestra tarea como médicos e investigadores. A ellos, a los pacientes y a sus familiares, especialmente a los que padecen enfermedades minoritarias, quiero agradecer la confianza que me han mostrado. Gracias también a todos aquellos pacientes que de forma

altruista han colaborado en los trabajos de investigación que constituyen esta tesis.

Gracias a mis amigos, por compartir tan buenos momentos y poblar la tierra con su descendencia; en especial a Susana, por contagiarme su indomable energía.

El agradecimiento más profundo se lo debo a mis padres, Javier y Feli, ellos me han querido de una forma absolutamente incondicional y han puesto ilusión y sacrificio, a partes iguales, para que yo pudiera elegir libremente y desarrollar mi profesión. Sois mis héroes.

Gracias a mi hermana, Miriam, amiga y confidente. Ella ha estado pendiente de mí en muchos momentos difíciles y ha sido un gran apoyo para redactar esta tesis. Espero que traigas ese oro líquido de las tierras belgas para que lo celebremos.

Gracias a Iván, mi compañero e intérprete de mis sueños. Él conoce perfectamente el esfuerzo que me ha supuesto redactar esta tesis y me ha apoyado día a día. Gracias por compartir mi vida, mis ilusiones y sujetar la hamaca en la que descanso cada día.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que he encontrado a lo largo del tiempo, y que me han enseñado, con su rigor y dedicación científica, de qué material está hecha la ciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	15
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 El Ictus Isquémico	19
1.1.1 Epidemiología y Factores de Riesgo	25
1.1.2 Diagnóstico del Ictus Isquémico	25
1.1.2.1 Pruebas de Evaluación Diagnóstica	29
1.1.2.2 Etiología del Ictus Isquémico. La Clasificación TOAST	33
1.1.3 Tratamiento del Ictus Isquémico en Fase Aguda	33
1.1.3.1 El Tratamiento Fibrinolítico	33
1.1.3.2 Otros Tratamientos	38
1.1.3.3 Eficacia del Tratamiento Fibrinolítico: la Recanalización del vaso	40
1.1.3.4 Seguridad del Tratamiento Fibrinolítico: la Transformación Hemorràgica	44
1.1.4 Pronóstico del Ictus Isquémico	48
1.1.4.1 Pronóstico Vital	48
1.1.4.2 Pronóstico Funcional	49
1.1.4.3 Factores Pronósticos	50
1.2 Los Biomarcadores en el Ictus	51
1.2.1 Utilidad de los Biomarcadores en el Ictus	51
1.2.2 Biomarcadores y Diagnóstico del Ictus	54
1.2.2.1 Biomarcadores relacionados con el Diagnóstico del Ictus	57
1.2.2.2 Caspasa 3	61
1.2.2.3 Dímero D	64
1.2.2.4 S100B	68
1.2.2.5 Srage	72
1.2.3 Biomarcadores y Tratamiento del Ictus Isquémico	76

1.2.3.1 Biomarcadores relacionados con la Eficacia del Tratamiento Fibrinolítico	77
1.2.3.2 Trombina	78
1.2.3.3 Biomarcadores relacionados con la Seguridad del Tratamiento Fibrinolítico	84
1.2.3.4 Poteína C Activada (APC)	88
1.2.4 Biomarcadores y Pronóstico del Ictus	
1.2.4.1 Biomarcadores relacionados con el Pronóstico del Ictus	92
1.2.4.2 Osteopontina (OPN)	95
1.2.4.3 Péptido Natriurético Cerebral (BNP)	97
2. OBJETIVOS	105
3. COPIA DE LAS PUBLICACIONES	107
3.1 <i>Biomarcadores plasmáticos en la enfermedad vascular cerebral isquémica</i>	109
3.2 <i>A panel of biomarkers including caspase-3 may differentiate acute stroke from stroke mimicking conditions at the emergency department</i>	111
3.3 <i>Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100b/rage pathway</i>	129
3.4 <i>Lower concentrations of thrombin-antithrombin complex (tat) correlate to higher recanalisation rates among ischaemic stroke patients treated with t-PA ...</i>	147
3.5 <i>Endogenous activated protein c predicts hemorrhagic transformation and mortality after tissue plasminogen activator treatment in stroke patients</i>	149
3.6 <i>Osteopontin predicts long-term functional outcome among ischemic stroke patients</i>	151
3.7 <i>Brain natriuretic peptide predicts worsening and mortality in acute stroke patients</i>	169
4. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	179
5. CONCLUSIONES	201
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205
7. ANEXOS	239

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ACRONIMOS

ACM: arteria cerebral media	Fn: fibronectina
AGEs: advanced glycation endproducts	FpA: fibrinopéptido A
AGTRL1: gen del receptor de la angiotensina II	GFAP: glial fibrillary acidic protein
AIT: accidente isquémico transitorio	GWAS: genome wide association study
ALOX5AP: arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	HDL: high-density lipoprotein
ANP: péptido natriurético atrial	HIF-1α: hypoxia-inducible factor 1 alfa.
APC: activated protein C	HTA: hipertensión arterial
AST: Australian Streptokinase Trial	ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1
AUC: area under curve	IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
BHE: barrera hematoencefálica	IL-1Ra: interleukin 1 receptor antagonist
BNP: brain natriuretic peptide	INE: Instituto Nacional de Estadística
CHARGE: Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology	INF: interferon
CNP: péptido natriurético de tipo C	LCR: líquido cefalorraquídeo
DD: dímero D	LDL: low-density lipoprotein
DIAS: Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial	LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1
DNA: deoxyribonucleic acid	LRP: low density lipoprotein receptor-related protein
DTC: doppler transcraneal	MAST: Multicenter Acute Stroke Trial
DW: difusión weighted	MCP: proteína quimiotáctica de monocitos
ECA: enzima convertidora de la angiotensina	MDA: malondialdehído
ECASS: European Cooperative Acute Stroke Study	MMPs: metaloproteinasas
ECG: electrocardiograma	mRNA: RNA mensajero
EPCR: receptor de la proteína C	mRS: modified Rankin Scale
FasL: fas ligando	
FDA: Food and Drug Administration	

NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

NNT: número necesario a tratar

NPR-A: receptor de péptidos natriuréticos de tipo A

NTproBNP: fragmento N-terminal del péptido proBNP

OPN: osteopontina

OR: odds ratio

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PAR: receptor activado por proteasa

PARP: poli-(ADP-ribosa)-polimerasa

PCR: proteína C reactiva

PDE4D: fosfodiesterasa 4D

PDF: producto de degradación de la fibrin

PH: parenchymal hematoma

PRKCH: gen de la protein kinase C eta type

RM: resonancia magnética

ROS: reactive oxygen species

RR: riesgo relativo

rt-PA: recombinant tissue plasminogen activator

SITS-MOST: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study

SNP: single nucleotide polymorphism

sRAGE: soluble receptor for advanced glycation endproducts

STARS: Stroke Treatment using Acute Reperfusion Simvastatin

TACI: total anterior cerebral infarction

TAFI: thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

TAT: trombina-antitrombina

TC: tomografía computerizada

TEP: tromboembolismo pulmonar

TGF: transforming growth factor

TH: transformación hemorrágica

TIBI: Thrombolysis in Brain Ischemia

TNF: tumoral necrosis factor

TNK: tenecteplase

TVC: trombosis venosa cerebral

TVP: trombosis venosa profunda

VCAM-1: vascular adhesion molecule-1

VSG: velocidad de sedimentación globular

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL ICTUS ISQUÉMICO.

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA y FACTORES DE RIESGO

El ictus se define como un déficit neurológico focal de aparición súbita debido a la obstrucción o rotura de un vaso sanguíneo cerebral. A pesar de los avances en su prevención, diagnóstico y tratamiento, constituye la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad del adulto en los países desarrollados (Lloyd-Jones et al., 2009). En nuestro país, según el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2007), el ictus sigue siendo la segunda causa de muerte por entidades específicas por detrás de la cardiopatía isquémica y la primera causa de muerte en las mujeres. En el año 2006, la prevalencia de la enfermedad se situaba en el 7,5% de la población mayor de 65 años (Medrano et al., 2006). Supone, por tanto, un problema de gran impacto socio-sanitario con importantes repercusiones económicas si consideramos que es una enfermedad altamente invalidante y que el gasto medio anual por paciente se estima en 13.383€ (Truelsen et al., 2005). Según la previsión realizada en la oficina estadística comunitaria Eurostat (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu>), el 30% de la población será mayor de 65 años en el año 2050 y es entonces previsible que el impacto del ictus aumente, puesto que esta enfermedad acontece principalmente a partir de los 60-65 años.

El ictus puede clasificarse en isquémico o hemorrágico según se mantenga o no la integridad del vaso sanguíneo implicado. El 87% de los ictus son isquémicos y se deben a la obstrucción de un vaso, generalmente arterial, con la consiguiente disminución en el aporte de oxígeno y nutrientes al parénquima cerebral. Por otro lado, la rotura de un vaso con extravasación del contenido sanguíneo, producirá un ictus hemorrágico, que representa el 13% del total de ictus (Lloyd-Jones D et al., 2009). El objeto de estudio de esta tesis es la identificación de marcadores biológicos en el ictus isquémico que permitan guiar en la práctica clínica los procesos de diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

Se han descrito varios factores de riesgo, modificables y no modificables, para el ictus isquémico. En cuanto a los factores de riesgo no modificables, también llamados marcadores de riesgo, la edad es el más conocido y se sabe que a partir de los 55 años el riesgo de ictus se duplica por cada década y se triplica a partir de los 80 años (Sacco et al., 1997). Por otra parte, la incidencia de isquemia cerebral es mayor en varones, estimándose una tasa estandarizada por edad (de 45 hasta 84 años) de 362 hombres y 186 mujeres por cada 100.000 habitantes (Redondo et al., 2008).

Entre los factores de riesgo modificables, el más frecuente es la hipertensión arterial (HTA). Así, las personas con niveles de presión arterial inferiores a 120/80 mmHg tienen la mitad de riesgo de sufrir un ictus que los hipertensos a lo largo de su vida (Lloyd-Jones D et al., 2009). La reducción de la presión arterial, tanto con fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAs), diuréticos o calcio-antagonistas se ha mostrado eficaz en la reducción del riesgo (Klungel et al., 2000; Mancia et al., 2007). También la diabetes mellitus se asocia de forma independiente con la enfermedad cerebrovascular, especialmente con la de tipo aterotrombótico. Se le atribuye un riesgo relativo de 1,8 para los hombres y de 2,2 para las mujeres (Barrett et al., 1988). Por otro lado, la relación de la hipercolesterolemia con la isquemia cerebral no está tan bien establecida como con la cardiopatía isquémica. Sin embargo, varios estudios han relacionado las cifras de LDL >130mg/dL y de HDL <35mg/dL (Pedro-Botet J et al., 1992; Gorelick et al., 1997) con el ictus isquémico y se conoce la importancia del tratamiento con fármacos hipolipemiantes para evitar la recurrencia vascular tras un primer evento coronario o cerebrovascular (Bogousslavsky J et al., 2000).

El tabaquismo está relacionado con la enfermedad vascular cerebral isquémica, multiplicando por dos el riesgo de ictus (Bogousslavsky J et al., 2000). También los fumadores pasivos tienen mayor riesgo de ictus isquémico, que se ha estimado con una odds ratio (OR) de 1,25 (IC95% 1,16-1,36) (Lee et al., 2006). El riesgo se incrementa con el número de cigarrillos y, así, la OR pasa de 2,1 (IC95% 1,5-3,3) cuando el consumo es menor de 10 cigarrillos

diarios a 9,1(IC95% 3,2-26) para consumos superiores a 40 cigarrillos diarios, según un reciente estudio realizado en mujeres menores de 50 años (Bhat et al., 2008). Por otra parte, el consumo de alcohol diario por encima de 60 gr se asocia a un incremento del riesgo relativo (RR) de isquemia cerebral de 1,69 (IC95% 1,34-2,15), aunque un consumo moderado se relaciona con un descenso del riesgo, RR 0,72 (IC95% 0,57-0,91), según un meta-análisis publicado en 2003 (Reynolds et al., 2003).

En cuanto a la obesidad, se estima que el 22% del total de muertes por enfermedad cardiovascular en España serían atribuibles al sobrepeso (índice de masa corporal ≥ 25) (Banegas et al., 2003) y la actividad física se ha relacionado con un descenso del riesgo de ictus, probablemente por el efecto beneficioso que tiene sobre la glucemia, presión arterial y perfil lipídico (Evenson et al., 1999; Bogousslavsky et al., 2000).

Dentro de los factores de riesgo clásicos, las cardiopatías se observan hasta en el 41% de los enfermos con ictus (Martí-Vilalta et al., 1999). La fibrilación auricular, la arritmia más prevalente en la población general, aumenta 5 veces el riesgo de presentar un infarto cerebral cardioembólico respecto a los que no la tienen (Wolf et al., 1992; Lloyd-Jones et al.). Otras arritmias, como el flúter auricular, la fibrilación-fluter o el síndrome del seno enfermo también incrementan el riesgo de embolismo cerebral (Wood et al., 1997; Mattioli et al., 1997). Por otra parte, las valvulopatías, especialmente la estenosis mitral, se relacionan con el infarto embólico y se calcula que la asociación de fibrilación auricular y estenosis mitral aumenta hasta 18 veces el riesgo de ictus isquémico (Bogousslavsky et al., 2000). También la enfermedad coronaria incrementa el riesgo de enfermedad cerebrovascular y así, se ha encontrado que los pacientes con enfermedad coronaria presentan una tasa del 0,7%-4,7% de ictus en las cuatro semanas posteriores a la aparición del infarto de miocardio (Wolf et al., 1998).

En cuanto a los factores de riesgo emergentes, cada vez hay más evidencias de la repercusión cardiovascular del síndrome de apnea obstructiva del sueño y se ha descrito que pacientes con apnea grave tienen 3,6 veces

más riesgo de sufrir un ictus isquémico después de un primer episodio coronario (Calvin et al., 2009). Otros factores, como la elevación de la homocisteína, la lipoproteína A o la fosfolipasa A2 en el plasma, la migraña, los estados pro-inflamatorios, las infecciones o el síndrome metabólico precisan de estudios más profundos.

VARIABLES	RIESGO RELATIVO
Edad, /año	1,06 (1,04-1,09)
Presión arterial sistólica, /20mmHg de incremento	1,16 (1,01-1,34)
Tabaquismo	1,52 (1,03-2,24)
Diabetes Mellitus	1,90 (1,25-2,89)
Fibrilación auricular	2,29 (1,29-4,04)
Enfermedad coronaria	1,49 (1,04-2,16)
Nivel de Homocisteína	1,82 (1,14-2,91)

La tabla muestra el riesgo relativo de los predictores de la incidencia de ictus isquémico, incluyendo la homocisteína, en la cohorte del estudio Framingham. Modificado de Bostom et al., 1999.

El factor genético también influye en la enfermedad cerebrovascular, puesto que la historia familiar de ictus en un pariente de primer grado se asocia a un mayor riesgo de ictus (Myundura et al., 2009; Kyeli et al., 1993) y además, la prevalencia de ictus en los gemelos univitelinos es 5 veces superior a la de los bivitelinos (Brass et al., 1992; Bak et al., 2002). En los últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable en la investigación de la base genética de la enfermedad cerebrovascular. Actualmente se considera que el ictus común es una enfermedad poligénica o compleja, en la que tanto factores externos como factores de susceptibilidad genética confluyen para finalmente dar lugar a la enfermedad. Estos factores genéticos son múltiples pero con un efecto relativamente pequeño cada uno. En este campo, se han realizado numerosos estudios de asociación genética siguiendo diferentes estrategias, como los estudios de ligamiento masivo, estudios de gen candidato, o estudios de asociación masiva con técnicas de alto rendimiento.

Los análisis de ligamiento masivo permiten identificar variantes genéticas asociadas con una enfermedad o un rasgo, sin establecer hipótesis a priori sobre su localización o función. En este tipo de estudios se incluyen familias, generalmente con un mínimo de 3 miembros, y en ellos se analizan marcadores genéticos que cubren todo el genoma. Posteriormente se calcula el grado de ligamiento de estos marcadores con la enfermedad estudiada y se secuencian la región que rodea al marcador para intentar localizar los genes responsables. Siguiendo esta aproximación, en el año 2003, Gretarsdottir y colaboradores describieron la asociación del gen que codifica para la fosfodiesterasa 4D (*PDE4D*) con el ictus, tras estudiar 100 familias con ictus en Islandia (Gretarsdottir et al., 2003). Esta proteína degrada al segundo mensajero cAMP, que tiene un papel central en la transducción de señales y la regulación de las respuestas fisiológicas en múltiples células, como las células endoteliales, células de músculo liso o inflamatorias (Dominiczak et al., 2003; Dichgans et al., 2007) y se piensa que podría estar involucrada en el desarrollo de la aterosclerosis (Gretarsdottir et al., 2003). Posteriormente, el mismo grupo islandés, observó que un haplotipo constituido por 4 polimorfismos de cambio de nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism o SNPs) en el gen *ALOX5AP* duplicaba el riesgo de sufrir un infarto de miocardio o un ictus (Helgadottir et al., 2004). Este gen codifica para una proteína activadora de la 5-lipoxigenasa, la cual participa en las fases iniciales de la síntesis de los leucotrienos y podría relacionarse con el ictus a través de sus efectos proinflamatorios y la producción de especies reactivas de oxígeno, que contribuirían al desarrollo de la aterosclerosis (Dixon et al., 1990). Sin embargo, en los años siguientes, se han realizado numerosos estudios intentando replicar estos hallazgos, con resultados variables y a veces incluso contradictorios. Un reciente metanálisis en 5200 casos y 6600 controles mostró que ninguna variante individual en el gen *PDE4D* se asociaba a ictus isquémico de forma robusta y la conclusión fue que las posibles asociaciones deben ser débiles y posiblemente dependientes del subgrupo de población estudiado (Bevan et al., 2008).

La estrategia más comúnmente utilizada ha sido el estudio de genes candidatos, que requiere la identificación previa de genes relevantes que puedan estar asociados con la enfermedad, bien por su función o por su

localización en el genoma. Una vez seleccionados, se estudian variantes de estos genes en un grupo de pacientes y controles. En el ictus isquémico se han explorado múltiples genes relacionados principalmente con el metabolismo lipídico, la inflamación, el metabolismo del óxido nítrico y de la homocisteína, el sistema renina-angiotensina-aldosterona o el sistema de la hemostasia. Al igual que sucedía con los estudios de ligamiento masivo, los resultados, en general, resultan difíciles de replicar. Esto se debe a que el efecto de cada una de estas variantes es pequeño, los tamaños muestrales necesarios son muy grandes, especialmente cuando se intenta estudiar por separado cada una de las etiologías del ictus y, por otro lado, en los estudios publicados el fenotipo ha sido evaluado de forma diferente (Domingues-Montanari et al., 2008).

Por último, los estudios de asociación masiva con técnicas de alto rendimiento, también llamados Genome Wide Association Scan (GWAS), cubren aproximadamente el 95% del genoma, mediante la determinación de hasta 1 millón de SNPs en muestras muy amplias, de miles de pacientes. Tienen la ventaja de que no necesitan una hipótesis previa y, de este modo, pueden identificar factores de susceptibilidad totalmente nuevos. El principal escollo es la necesidad de potentes herramientas informáticas y personal especializado para el análisis de una ingente cantidad de datos. En el año 2007, se publicó el primer estudio GWAS en ictus isquémico que se realizó analizando aproximadamente 400.000 SNPs en una cohorte de 249 pacientes y 268 controles (Matarín et al., 2007). Aunque ninguna de las regiones identificadas alcanzó la significación estadística reconocida hoy en día en este tipo de estudios, se observaron algunas asociaciones de SNPs en regiones o genes de gran interés, como algunos genes involucrados en el transporte de potasio, que posteriormente han sido replicados con éxito en poblaciones independientes (Domingues-Montanari et al., 2009). Posteriormente, Kubo y colaboradores encontraron que una variante (1425G/A) en el gen de una proteína quinasa C (*PRKCH*), que produce el cambio de una valina por una isoleucina en la posición 374 de la proteína, se asocia a ictus de tipo lacunar, posiblemente también por su papel en el desarrollo de ateromatosis (Kubo et al., 2007). Los mismos autores también identificaron 4 SNPs alrededor del gen del receptor de la angiotensina II (*AGTRL1*) y comprobaron, en una cohorte

seguida durante 14 años, que se relacionaban de forma independiente con la incidencia de ictus (Hata et al., 2007). De nuevo en población islandesa, se ha realizado un GWAS cuyos resultados se han replicado en dos muestras de población europea, mostrando cómo una variante en la región 4q25, previamente relacionada con la fibrilación auricular, se asocia también con ictus de etiología cardioembólica (Gretarsdottir et al., 2008). Por otro lado, Ikram y colaboradores encontraron una nueva región de interés situada en el cromosoma 12p13, tras analizar los resultados de los GWAS realizados en 4 cohortes de pacientes y controles que constituyen el CHARGE consorcio (Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology) (Ikram et al., 2009). En este estudio, una variante cercana al gen *NINJ2*, que codifica una molécula de adhesión sobreexpresada en la glía tras un daño neural, se encontró asociada con un riesgo incrementado de ictus global e isquémico. En población japonesa, Yamada y colaboradores han descrito un nuevo gen, *CELSR1*, relacionado con el ictus isquémico de etiología aterotrombótica tras analizar unos 520.000 SNPs en un total de 992 pacientes con ictus aterotrombóticos y 5349 controles (Yamada et al., 2009). Este gen codifica un receptor de la familia de las cadherinas, moléculas de adhesión fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso, cuya función depende del anclaje del dominio intracitoplasmático al citoesqueleto y que son capaces de unirse a varios ligandos. En este estudio se ha encontrado una asociación entre un SNP en el gen *CELSR1* y la diabetes mellitus de tipo II, por lo que se piensa que la relación con el ictus, al menos en parte, podría deberse a un efecto en la diabetes mellitus.

1.1.2 DIAGNÓSTICO DEL ICTUS ISQUÉMICO.

1.1.2.1 PRUEBAS DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

La batería de pruebas de evaluación necesarias para el estudio del paciente con ictus comprende una serie de pruebas básicas como un análisis de sangre, incluyendo hemograma, recuento de leucocitos y plaquetas, velocidad de sedimentación globular (VSG), tiempos de coagulación, glucosa, urea, creatinina, perfil lipídico, serologías de enfermedades inmunológicas e

infecciosas; electrocardiograma (ECG); una prueba de neuroimagen mediante tomografía computerizada (TC) o resonancia magnética (RM); el estudio de los troncos supraaórticos y arterias intracraneales con la ecografía doppler-duplex; y una evaluación de problemas estructurales cardiacos mediante la ecografía transtorácica.

Algunos pacientes pueden necesitar otras pruebas complementarias para establecer la etiología, como la realización de pruebas especiales de trombofilia (niveles de la proteína C, proteína S, antitrombina III, homocisteína, anticuerpos antifosfolípidos, presencia del factor V Leiden o de la mutación G20210A del gen de la protrombina), ecocardiograma transesofágico, monitorización continua (Holter)-ECG, angiografías no invasivas como la angio-RM o angio-TC o la realización de una arteriografía convencional.

Aunque las imágenes isquémicas pueden no observarse en la TC durante las primeras horas en aproximadamente 2/3 de los pacientes con sospecha de ictus (Adams et al., 2007), esta prueba permite detectar signos indirectos precoces de isquemia en el territorio de la arteria cerebral media (ACM), como el signo de la ACM hiperdensa, la pérdida de diferenciación entre la sustancia blanca y gris, el borramiento de los surcos corticales o del núcleo lenticular. Por otra parte, la TC también sirve para detectar la presencia de una hemorragia intracraneal y descartar otras entidades que se presentan con una clínica semejante a un ictus (mimics), como un tumor intracraneal. Otra prueba de neuroimagen utilizada en la fase aguda es la RM, que permite identificar las áreas isquémicas de forma más precoz, especialmente con las secuencias de difusión (DW). Además, las técnicas de difusión/perfusión muestran las áreas de penumbra isquémica, potencialmente salvables, y por tanto, pueden ayudar a guiar el tratamiento en la fase aguda del ictus. De todas formas, aunque la RM puede aportar información muy valiosa sobre la naturaleza isquémica del déficit neurológico, todavía debe superar varios obstáculos para poder ser ampliamente utilizada. En primer lugar, en las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas, su sensibilidad para detectar un ictus isquémico no es mayor del 73% (Chalela et al., 2007). Además no está disponible en la mayor parte de los centros y el tiempo necesario para la obtención de las secuencias

convencionales es mayor que en el caso de la TC. Otra prueba, la ecografía doppler-duplex, es fundamental para mostrar la presencia de enfermedad ateromatosa de los grandes vasos. No obstante, presenta algunas limitaciones, puesto que la detección de la estenosis carotídea >50% tiene una sensibilidad del 98% (IC95% 97-100%) y una especificidad del 88% (IC95% 76-100%) (Jahromi et al., 2005).

Por otro lado, en un subgrupo pequeño de pacientes, el ictus puede ser la expresión de una enfermedad monogénica, como es el caso de la enfermedad de Fabry o el síndrome Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarctions and Leukoencephalopathy (CADASIL). Otras enfermedades monogénicas que pueden cursar con ictus son el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, el pseudoxantoma elasticum o el síndrome Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS). Estos pacientes requieren una evaluación más exhaustiva en una consulta especializada, que incluya la realización de un árbol familiar completo, revisión de los antecedentes personales sugestivos, evaluación de síntomas o signos de afectación del sistema conjuntivo y exploración de la úvula, las articulaciones, la piel y el fondo de ojo. En ocasiones es necesario solicitar exploraciones complementarias como una biopsia de piel o músculo, una angiografía con fluoresceína, análisis bioquímicos o enzimáticos específicos o el estudio molecular del gen correspondiente.

En general, podemos afirmar que todo este conjunto de pruebas se utiliza fundamentalmente para la clasificación etiológica del ictus y hoy en día el diagnóstico inicial de ictus todavía se basa en la evaluación clínica de los síntomas y signos del paciente, con el apoyo de las pruebas de neuroimagen, siendo la más utilizada la TC. Así, la presencia de un déficit neurológico brusco que corresponda a un territorio vascular cerebral, junto con la ausencia de hallazgos radiológicos en la TC, se considera suficiente para diagnosticar un ictus isquémico. Una vez establecido el diagnóstico de ictus la gravedad del mismo se puede valorar mediante la aplicación de una escala, siendo la más ampliamente utilizada la National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)

(anexo1) en la que se considera que, a mayor puntuación, mayor gravedad del déficit neurológico.

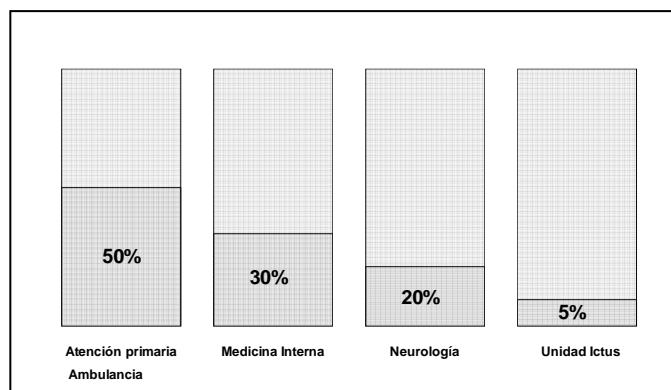
En cualquier caso, al carecer de pruebas complementarias que confirmen el diagnóstico, los mimics siguen representando una proporción elevada (19-31%) de los pacientes que son trasladados a urgencias con la sospecha inicial de ictus (Libman et al., 1996; Hand et al., 2006). En este sentido, resulta sorprendente un reciente estudio realizado en el Reino Unido, en el que sólo un 30% de los pacientes referidos al hospital por médicos de atención primaria con sospecha de ictus presentaba realmente un episodio cerebrovascular (McNeill et al., 2008). Las causas que simulan un ictus varían según las diferentes series publicadas pero las más frecuentes son los estados post-epilépticos, el síncope y las alteraciones tóxicas-metabólicas como la hipoglucemia o la sepsis (Libman et al., 1996; Nor et al., 2005; Hand et al., 2006).

MIMICS	ROSIER study N=167	The Brain Attack Study N=109	Media (%)
Crisis Epiléptica	24%	21,1%	22,6%
Síncope/Presíncope	23%	9,2%	16,1%
Sepsis	10%	12,8%	11,4%
Migraña	6%	2,8%	4,4%
Somatización	5%	5,5%	5,25%
Tóxica-metabólica	4%	11%	7,5 %
Laberintitis	4%	6,4%	5,2 %
Tumor cerebral	3%	9,2%	6,1%
Demencia	2%	3,7%	2,9%
Síndrome confusional	2%	6,4%	4,2%
Neuropatía/radiculopatía	2%	5,5%	3,7%
Otras	13%	6,5%	9,75%

La tabla muestra la prevalencia de las diferentes entidades que pueden simular un ictus (mimics) en las series publicadas y la media obtenida de dichas series. Datos tomados de Hand et al., 2006; Nor et al., 2005.

Además, el grado de precisión en el diagnóstico clínico del ictus al inicio de los síntomas y su diferenciación de los mimics depende en gran medida del nivel de asistencia sanitaria en que se realice. El mayor porcentaje de mimics se encuentra en las etapas iniciales de *triage* del paciente, que se realiza habitualmente por personal paramédico o médicos de atención primaria, que

carecen de exploraciones de apoyo como las pruebas de neuroimagen. El porcentaje de falsos diagnósticos decrece conforme aumenta el nivel de especialización del personal sanitario, como se observa en la siguiente figura.



La figura muestra la proporción de mimics (gris oscuro) en los pacientes diagnosticados como pacientes con ictus agudo en base a los datos clínicos según los diferentes escenarios asistenciales.

1.1.2.2 ETIOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO. LA CLASIFICACIÓN TOAST.

La diferenciación etiológica de la enfermedad cerebrovascular es fundamental, puesto que de ella deriva en gran parte la actitud terapéutica que tomaremos ante el paciente. En la práctica clínica, podemos dividir los ictus isquémicos en 5 subtipos según su etiología utilizando la clasificación TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) (Adams et al., 1993), la cual ha facilitado en gran medida la estandarización del diagnóstico de ictus, especialmente para la realización de ensayos clínicos:

- *Ateromatosis de gran vaso*, cuando el paciente presenta enfermedad ateromatosa con estenosis >50% en la luz de un vaso grande que irriga el territorio donde se ha producido un infarto >1,5 cm. La isquemia puede ser consecuencia de la oclusión del flujo por un trombo formado sobre una placa de ateroma complicada o de un embolismo arterio-arterial.

- *Cardioembolismo*, cuando un infarto >1,5 cm se produce como consecuencia de la oclusión de una arteria por un émbolo, presumiblemente procedente de las cavidades cardiacas. Las fuentes embolígenas cardiacas se dividen en de alto riesgo y de riesgo medio.
- *Enfermedad de pequeño vaso o ictus lacunar*, que son lesiones de pequeño tamaño, <1,5 cm, que cursan con alguno de los síndromes lacunares clásicos, sin afectación cortical, producidas como consecuencia de microateromatosis y/o lipohialinosis de las arterias perforantes cerebrales. Los pacientes suelen tener HTA o diabetes mellitus.
- *Etiología inhabitual*, es el infarto que ocurre en pacientes sin factores de riesgo y tras haber descartado las etiologías anteriores. Comprende un grupo muy heterogéneo de enfermedades incluyendo arteriopatías no arterioescleróticas, como arteritis o arteriopatías hereditarias; enfermedades sistémicas o alteraciones de la coagulación o viscosidad de la sangre. La causa más frecuente dentro de este grupo, especialmente en gente joven, es la disección de una arteria extra o intracraneal.
- *Etiología indeterminada*, esta categoría incluye la imposibilidad de establecer una causa de forma fiable por no haber realizado el estudio etiológico de forma completa, por coexistir dos o más causas o por no encontrar una etiología a pesar de haber realizado el estudio de forma completa.

Alto riesgo	Riesgo intermedio
Prótesis valvular cardíaca	Prolapso de la válvula mitral
Estenosis mitral con fibrilación auricular	Calcificación del anillo mitral
Fibrilación auricular	Estenosis mitral sin fibrilación auricular
Trombo en la aurícula izquierda	Turbulencias en la aurícula izquierda
Enfermedad del seno enfermo	Aneurisma del septo auricular
Infarto de miocardio reciente < 4 semanas	Foramen ovale permeable
Trombo en el ventrículo izquierdo	Flutter auricular
Cardiomiopatía dilatada	Fibrilación auricular aislada
Segmento acinético en el ventrículo izquierdo	Prótesis valvular biológica
Mixoma auricular	Endocarditis no bacteriana
Endocarditis infecciosa	Insuficiencia cardíaca congestiva
	Segmento hipocinético en el ventrículo izquierdo
	Infarto de miocardio > 4 semanas, < 6 meses

La tabla muestra las fuentes cardioembólicas de riesgo alto e intermedio, según la clasificación TOAST (Adams et al., 1993)

A pesar del avance que supone esta clasificación su aplicación tiene limitaciones. La principal es que la categoría Etiología Indeterminada está claramente sobrerrepresentada, llegando a suponer hasta un 25-30% del total de causas según las series estudiadas, siendo máximo en el grupo de pacientes menores de 55 años (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Bejot Y et al., 2008) Especialmente relevante es la asignación a este grupo de los pacientes en los que se identifican dos o más causas que pueden explicar el ictus. Además, desde la creación de la escala TOAST en 1990, se han incorporado nuevas técnicas de evaluación del ictus y ha aumentado su accesibilidad, por lo que cada vez se identifican más anomalías cardíacas o vasculares y, por tanto, se ha incrementado el porcentaje de pacientes en los que coexisten dos posibles causas de ictus. Así, en un 50-70% de los pacientes se detecta una fuente potencial cardioembólica cuando se utiliza el ecocardiograma (Comess et al., 1994) y el 12% de los pacientes con una fuente cardíaca de émbolos y el 22% de los pacientes con infartos lacunares presentan además una estenosis carotídea mayor del 50% en el vaso correspondiente al territorio afectado

(Tejada et al., 2003). Por este motivo, se han realizado esfuerzos encaminados a reducir esta creciente proporción de ictus de etiología indeterminada, como la creación de un algoritmo que incorpora datos epidemiológicos y de neuroimagen, el Stop Stroke Study-TOAST (SSS-TOAST) (Ay H et al., 2007).

Por otro lado, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación fenotípica del ictus que incorpora más información sobre la etiología y se basa en los niveles de evidencia de las pruebas diagnósticas (Amarenco et al., 2009). En esta clasificación, a diferencia de las previas que sólo consideran la etiología más probable, cada paciente recibe un grado para cada uno de los 4 componentes de la escala ASCO (A=Atherosclerosis; S=Small Vessel Disease; C=Cardiac Source; O=other cause) que van del 1 (causa definitiva) al 3 (causa improbable, pero presente). Cuando alguno de estos fenotipos no está presente se le asigna un 0 y en caso de que no se haya estudiado un 9. Por ejemplo, un paciente con un ictus en territorio de la ACM, que presenta una estenosis carotídea ipsilateral >70%, leucoaraiosis, fibrilación auricular y trombocitosis sería clasificado como A₁S₃C₁O₃. De esta forma, toda la información sobre las causas etiológicas del ictus queda registrada y permite determinar de forma más precisa los fenotipos, lo que puede tener gran utilidad en estudios de asociación genética o en ensayos clínicos. Además, la clasificación es dinámica y puede reflejar la existencia de solapamiento entre los diferentes componentes sin que ninguno quede excluido. Por otro lado, la información se complementa con el nivel de evidencia científica para las pruebas realizadas que se clasifica como nivel de evidencia A (utilización de la prueba gold-estándar para demostrar la presencia de ese fenotipo), B (utilización de una prueba menos sensible y/o específica que el gold-estándar) o C (evidencia indirecta por falta de pruebas sensibles y/o específicas).

Otro problema en el estudio etiológico del ictus es la ausencia de pruebas gold estándar adecuadas, como la anatomía patológica para definir el mecanismo etiológico exacto que ha producido el ictus puesto que la gran mayoría de pacientes sobreviven al episodio cerebrovascular. Puesto que el problema de asignar una etiología a cada ictus es cada vez más relevante, el

uso de nuevas técnicas que aporten información etiológica, como los biomarcadores, tiene un interés renovado en el campo de la enfermedad cerebrovascular.

1.1.3 TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO EN FASE AGUDA

1.1.3.1 EL TRATAMIENTO FIBRINOLÍTICO

Una de las medidas que ha supuesto una mejora sustancial en el manejo del ictus es la implantación de Unidades de Ictus para el tratamiento de los pacientes en la fase aguda. En un meta-análisis publicado en el año 2007 y que englobó el análisis de 6.936 pacientes en 31 centros, se demostró que el ingreso en una Unidad de Ictus comparado con la planta general supone una reducción de la mortalidad (OR 0,86 IC95% 0,76-0,98; $p=0.02$) y de la dependencia o institucionalización del paciente (OR 0,82 IC95% 0,73-0,92; $p=0,0006$) al cabo de 1 año (Stroke Unit Trialists' Collaboration, 2007). En la Unidad de Ictus, además de las medidas generales, como el control de las cifras tensionales, de la temperatura y el nivel de glucosa o mantener la vía aérea permeable, se pueden iniciar tratamientos encaminados a conseguir la revascularización de la arteria ocluida. En este momento, la estrategia principal consiste en utilizar un fármaco trombolítico, siendo el más utilizado el alteplase, un fármaco semejante a la molécula de t-PA (tissue plasminogen activator) obtenido por tecnología recombinante (rt-PA).

En el año 1996, la Food and Drug Administration (FDA) americana aprobó el uso de rt-PA intravenoso para el ictus isquémico en las 3 primeras horas tras el inicio de los síntomas. El National Institut of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) Stroke Study Group había demostrado que el tratamiento con este fármaco en ese periodo mejoraba clínicamente el estado de los pacientes a los 3 meses del ictus sin aumentar la mortalidad (NINDS study group, 1995). El principal problema encontrado fue que la hemorragia intracraneal, que ocurría de media en las primeras 36 horas tras el inicio del tratamiento, era 10 veces más frecuente en el grupo de los pacientes tratados respecto a los que recibieron

placebo (6,4% vs. 0,6%). Esta complicación ha limitado y aún limita la administración del rt-PA en la fase aguda del ictus, de manera que sólo se puede administrar por personal especializado, en un periodo corto de tiempo y tras comprobar que el paciente cumple una larga serie de criterios.

Varios estudios han fracasado en su intento de demostrar la eficacia y seguridad del rt-PA administrado en una ventana ampliada hasta las 6 horas tras el inicio de los síntomas. En el estudio The Second European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS-II) (Hacke et al., 1998) se observó que en el 8,8% de los pacientes tratados con alteplase apareció transformación hemorrágica (TH) comparado con el 3,4% del grupo placebo y la mortalidad a los 3 meses fue del 22,4% en los pacientes tratados frente al 15,8% de los pacientes que recibieron placebo. Un estudio previo, en 620 pacientes en los que se administraba una dosis de 1,1 mg/Kg de alteplase dentro de las 6 primeras horas (ECASS) también había fallado en demostrar una clara mejoría neurológica y la aparición de hemorragias intraparenquimatosas severas había sido significativamente superior entre los pacientes tratados (Hacke et al., 1995). En cualquier caso, la aprobación del tratamiento con rt-PA en Europa se hizo condicionado a la realización de un estudio de seguridad, el Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring STudy (SITS-MOST), que finalmente ha confirmado que el uso de rt-PA en las 3 primeras horas tras el inicio del ictus presenta un perfil de seguridad aceptable en la práctica clínica, siendo la tasa de hemorragia sintomática del 1,7% (1,4–2,0%) en las primeras 24 horas (Wahlgren et al., 2007, 2008). En este estudio participaron 700 centros pertenecientes a 35 países e inicialmente se evaluó la aparición de TH sintomática, la mortalidad y el estado funcional del paciente. Recientemente, y tras la publicación del estudio ECASS-III, se ha logrado ampliar la ventana terapéutica para realizar trombolisis intravenosa hasta las 4,5 horas tras el inicio de los síntomas (Hacke et al., 2008). Este estudio englobó un total de 821 pacientes a los que se administró el alteplase a las 3 horas 59 minutos de media tras el inicio de los síntomas. El 52,4% de los pacientes tuvieron un resultado favorable en relación a su situación funcional a los 3 meses del ictus frente al 45,2% de los pacientes asignados al grupo placebo. Aunque la incidencia de hemorragia intracraneal sintomática fue significativamente

superior en el grupo tratado (2,4% vs. 0,2%), la mortalidad no difirió entre ambos grupos (7,7% vs. 8,4%). En la actualidad, el único tratamiento aprobado en las primeras 4,5 horas tras el inicio del ictus isquémico es el rt-PA a dosis de 0,9 mg/kg de peso administrado el 10% en forma de bolo y el 90% restante en infusión continua intravenosa durante una hora. Además de la evidencia experimental, los resultados de un meta-análisis publicado en 2003 muestran cómo la administración de rt-PA intravenoso previene una muerte o dependencia por cada 7 pacientes tratados (Wardlaw et al., 2003).

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos fármacos fibrinolíticos que se puedan utilizar en el ictus isquémico aunque, por el momento, sólo el rt-PA ha conseguido la aprobación de las agencias sanitarias. La primera generación de fármacos trombolíticos estaba formada por la uroquinasa y la estreptoquinasa (SK), ambos con un efecto poco específico en el plasminógeno localizado en la malla de fibrina. A pesar de que en pacientes con infarto de miocardio la SK presentaba una menor tasa de sangrado intracraneal que los pacientes tratados con rt-PA, no hay suficientes datos que apoyen su uso en el ictus isquémico. Entre los años 1991 y 1995 tres estudios se realizaron con SK, el Multicenter Acute Stroke Trial-Europe (MAST-E), el Multicenter Acute Stroke Trial-Italy (MAST-I) y el Australian Streptokinase Trial (AST). Los tres estudios, en los que se administró la misma dosis intravenosa de SK de 1,5 millones de unidades durante 1 hora, tuvieron que ser prematuramente suspendidos debido a las elevadas tasas de mortalidad, principalmente atribuidas a los sangrados intracraneales, en el grupo que recibió el tratamiento (34-43%) frente al grupo que fue tratado con placebo (13-22%).

Junto con el rt-PA, la pro-uroquinasa recombinante (r-pro-UK) constituye la segunda generación de fármacos trombolíticos. En este caso el efecto farmacológico es específico para el plasminógeno unido a la malla de fibrina. La eficacia y seguridad de r-pro-UK fueron estudiadas en el ensayo Prourokinase in Acute Cerebral Thromboembolism II, que incluyó a 180 pacientes con una oclusión de la ACM probada angiográficamente que fueron tratados localmente con r-pro-UK intra-arterial dentro de las 6 primeras horas

tras el inicio del ictus (Furlan et al., 1999). Aunque el tratamiento intra-arterial se mostró claramente beneficioso, siendo el 40% de los pacientes independientes a los 3 meses frente al 25% de los que recibieron placebo, también se asoció a una tasa superior de hemorragia intracraneal con deterioro neurológico en las primeras 24 horas (10% frente al 2%) y, finalmente, la FDA no aprobó su uso en humanos.

La tercera generación de fármacos fibrinolíticos está formada por varias modificaciones genéticas del rt-PA, como el tenecteplase (TNK), reteplase, lanoteplase, pamiteplase y estafiloquinase. En estos fármacos se ha conseguido una mayor resistencia a la acción de los inhibidores o una mayor vida media. En la actualidad se está llevando a cabo un estudio en fase II (TNK-S2B) para valorar si el TNK es eficaz respecto al rt-PA en los pacientes con ictus isquémico. Este fármaco tiene una alta afinidad y especificidad por la fibrina y una mayor vida media que el rt-PA y se ha demostrado su seguridad a una dosis entre 0,1-0,4mg/Kg (Haley et al, 2005). Además, en un estudio no randomizado, se administró TNK a pacientes con una oclusión y un área de penumbra mayor del 20% respecto al core del infarto, demostradas mediante RM o TC, a dosis de 0,1 mg/Kg, entre las 3-9 horas desde el inicio del ictus. Comparado con un grupo de pacientes tratados con rt-PA en las primeras 3 horas de forma convencional, los que recibieron TNK mostraron mayores tasas de recanalización (10/15 vs. 7/29; $p=0,01$) (Parsons et al, 2009). También se está evaluando si el reteplase aumenta la eficacia del abciximab, un antiagregante que bloquea el receptor de la glicoproteína IIb/IIIa de la membrana plaquetar, administrados entre las 3 y las 24 horas tras el inicio del ictus (ROSIE-CT).

Además, un nuevo activador del plasminógeno, el desmoteplase, desarrollado de forma recombinante a partir de una sustancia presente en la saliva del murciélago *Desmodus rotundus*, ha sido probado en el estudio DIAS (Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial) (Hacke et al., 2005), a diferentes dosis, durante las 3-9 primeras horas desde el inicio de los síntomas, en un intento de ampliar la ventana terapéutica. Este fármaco es altamente específico para la fibrina, tiene mayor vida media que el rt-PA y además carece de efectos

neurotóxicos (Liberatore et al., 2003). Para su administración se seleccionaron aquellos pacientes que mostraban una zona de penumbra superior al 20% respecto a la zona necrosada en los estudios de neuroimagen con RM (difusión/perfusión) o TC (perfusión), es decir, pacientes con un mismatch superior al 20%. En el estudio publicado en el año 2005 se demostró que el desmoteplase, a una dosis de 125 µg/kg, se asociaba a mayores tasas de recanalización y mejor situación neurológica sin aumentar el riesgo de hemorragia intracraneal sintomática. Sin embargo, posteriormente, en el DIAS2, no se encontró mejoría en la situación neurológica y funcional de los pacientes tratados con desmoteplase, evaluada a los 3 meses tras el ictus, y las tasas de transformación hemorrágica sintomática y mortalidad fueron mayores en los pacientes que recibieron el fibrinolítico respecto de los que recibieron placebo (Hacke et al., 2009). En la actualidad otro ensayo semejante se está llevando a cabo en pacientes con oclusión vascular demostrada por TC o RM (DIAS-4).

Además de la fibrinólisis intravenosa, la aplicación de fibrinólisis intraarterial local parece eficaz y segura en las 6 primeras horas del ictus, aunque su uso todavía no está aprobado. En general se combina el uso de fibrinólisis intravenosa e intraarterial, cuando la primera no ha logrado el objetivo de recanalizar la arteria. En un estudio abierto se encontraron tasas de recanalización del 75% en los pacientes que eran tratados con rt-PA intraarterial en las primeras 6 horas del ictus (Poncyłjusz et al, 2007). De todas formas, la eficacia de la combinación de rt-PA intravenoso en primera instancia y fibrinólisis intra-arterial cuando no se consigue recanalizar la arteria está todavía por determinar. Actualmente está en marcha un ensayo clínico en fase III, el Interventional Management of Stroke (IMS)- III Trial, en el que se prueba la eficacia de la administración de rt-PA intravenoso a dosis de 0,6mg/Kg seguido de rt-PA intra-arterial en pacientes que no alcancen la recanalización demostrada mediante angiografía. Además de la administración de rt-PA local se puede utilizar un dispositivo mecánico o sonotrombolisis mediante un microcateter como coadyuvante en este estudio. Cabe destacar que este estudio tiene como objetivo secundario evaluar el coste-efectividad de esta aproximación respecto a la fibrinólisis convencional.

1.1.3.2 OTROS TRATAMIENTOS

Aunque la utilización en monoterapia de fármacos antagonistas de la GPIIb/IIIa plaquetaria, como el abciximab, ha resultado fallida tanto en eficacia como en seguridad (Adams et al., 2008), no se puede descartar que la utilización de estos fármacos a dosis inferiores o su uso como coadyuvantes de la fibrinólisis intravenosa o intra-arterial sea beneficiosa en la fase aguda del ictus isquémico (Straub et al., 2004). De hecho, en el tratamiento de la oclusión de la arteria basilar ya se han empleado estrategias combinadas, como la del estudio FAST, que empleaba abciximab junto con rt-PA intra-arterial y angioplastia transluminal cuando no se alcanzaba la recanalización en estos pacientes. La mortalidad y la situación neurológica de los pacientes fue considerablemente mejor comparada con una cohorte histórica a la que sólo se había administrado rt-PA intra-arterial (Eckert et al., 2005).

En la actualidad se está valorando la eficacia de algunos métodos invasivos de fibrinólisis mecánica en oclusiones intracraneales, especialmente en el territorio proximal de la ACM (Sorimachi et al., 2004). Entre los dispositivos desarrollados, dos han sido aprobados por la FDA, el MERCI® retriever, que consiste en un cable de titanio que termina en una punta helicoidal y el Penumbra System® que, junto a un catéter, utiliza un sistema capaz de separar el trombo y aspirarlo. En el año 2008 se publicó la experiencia en recanalización del sistema Penumbra (Bose et al., 2008), con datos prometedores y los resultados del Multi MERCI trial (Smith et al., 2008). En la actualidad hay un ensayo en marcha para comparar, de forma controlada y a simple ciego, la utilidad de estos dispositivos respecto al tratamiento convencional, durante las primeras 8 horas tras el inicio del ictus (MR-RESCUE- Mechanical Retrieval and REcanalization of Stroke Clots Using Embolectomy).

Otra estrategia empleada en el intento de recanalizar la arteria de forma temprana es la sonotrombolisis, como coadyuvante al tratamiento fibrinolítico. Los ultrasonidos utilizados en el diagnóstico son capaces de disgregar la malla

de fibrina exponiendo mayor territorio del trombo al plasma sanguíneo y permitiendo que el rt-PA actúe con mayor eficacia fibrinolítica (Alexandrov et al., 2009). En el estudio CLOTBUST (Alexandrov et al., 2004), se observó la recanalización completa a las 2 horas de iniciado el tratamiento en el 38% de los pacientes que recibieron sonotrombolisis coadyuvante frente al 13% de los que sólo recibieron rt-PA intravenoso, y ambos grupos presentaron la misma tasa de hemorragias sintomáticas (3,8%). Además, un meta-análisis reciente sugiere que el uso de cualquier dispositivo de monitorización con doppler puede como mínimo duplicar la posibilidad de recanalización completa sin incrementar el riesgo de hemorragia sintomática (Tsvigoulis et al., 2008). La utilización de microesferas gaseosas como potenciador del efecto de la sonotrombolisis también parece prometedor (Molina et al., 2006). Las microburbujas, que habitualmente son utilizadas como contraste en los estudios ultrasonográficos, pueden ser útiles en la disolución del trombo, puesto que absorben la energía de los ultrasonidos hasta que explotan en el interior del coágulo, facilitando de este modo la fragmentación del trombo. Molina y colaboradores mostraron cómo la administración de microburbujas en un grupo de 38 pacientes tratados con rt-PA y sonotrombolisis mejoraba la tasa de recanalización completa a las 2 horas de iniciado el tratamiento respecto a los pacientes que recibieron rt-PA y sonotrombolisis o sólo rt-PA (54,5% vs. 40,8% vs. 23,9; $p=0,038$). Incluso se han iniciado estudios para evaluar el tratamiento coadyuvante con microburbujas en los casos que reciben trombolisis intra-arterial (Ribó et al., 2009).

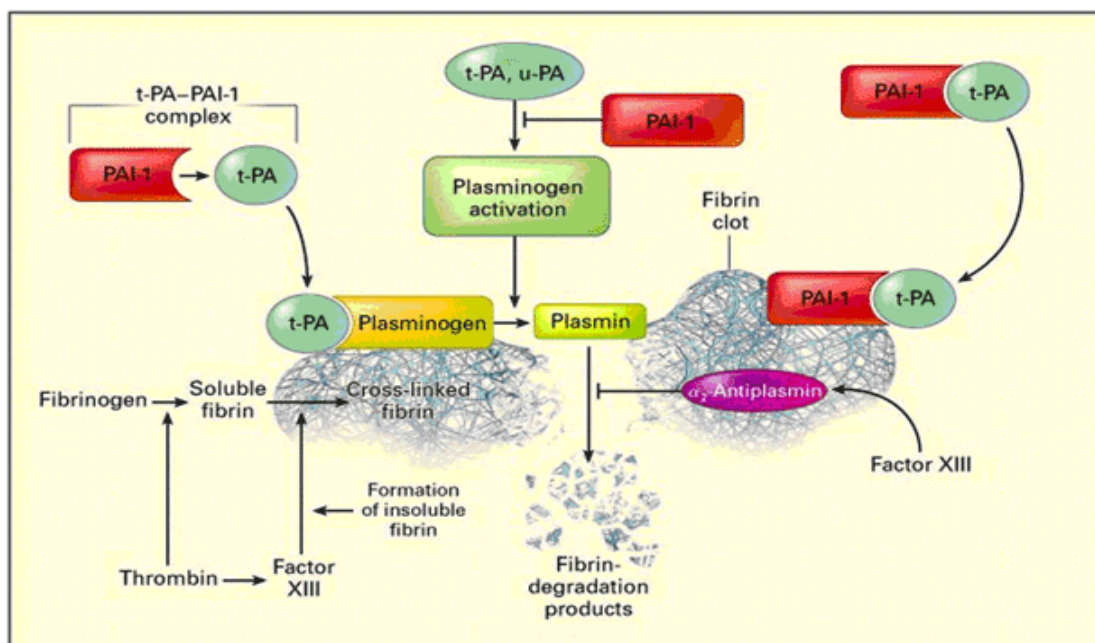
Por último, otro campo que aún está explorando es la utilización de fármacos neuroprotectores que intentarían limitar el daño isquémico o incluso incrementar el periodo ventana de la administración del fibrinolítico. Sin embargo, numerosos intentos han resultado fallidos hasta la fecha y ningún fármaco por el momento ha conseguido la autorización como tratamiento en la fase aguda del ictus. Entre estas moléculas, destaca la citicolina (CDC-colina), un intermediario de la síntesis de los fosfolípidos de las membranas celulares, que se ha probado en numerosos ensayos clínicos como agente neuroprotector durante la fase aguda del ictus. En un meta-análisis publicado en el año 2002, que incluyó a 1652 pacientes, se observó que, con un perfil de seguridad

semejante al placebo, la citicolina, a la dosis de 2000mg, producía una mejor situación neurológica y funcional al tercer mes comparada con el placebo (OR 1,38 IC95% 1,10-1,72; p=0.0043) (Dávalos et al., 2002). En el ámbito de la neuroprotección, otra molécula prometedora es la simvastatina, que se ha probado como tratamiento en la fase aguda del ictus en un estudio piloto multicéntrico que reclutó 60 pacientes con ictus corticales (Montaner et al., 2008). Estos pacientes recibieron simvastatina entre las 3-12 horas tras el inicio de los síntomas. Aunque la mejoría clínica de los pacientes era evidente desde el tercer día tras el ictus, se encontró un incremento de la mortalidad no estadísticamente significativo y de las infecciones en el grupo tratado frente al grupo placebo. En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico de mayor tamaño muestral para determinar la eficacia y seguridad de la simvastatina en la fase aguda del ictus, conocido como STARS (Stroke Treatment using Acute Reperfusion Simvastatin).

1.1.3.3 EFICACIA DEL TRATAMIENTO FIBRINOLÍTICO: LA RECANALIZACIÓN DEL VASO

La recanalización del vaso sanguíneo obstruido por un coágulo se producirá si los mecanismos de la fibrinólisis resultan eficaces. La fibrinólisis es el conjunto de reacciones que se activan ante la presencia de fibrina en el torrente sanguíneo y cuyo fin es la ruptura de la malla de fibrina que sustenta al coágulo. La enzima central activadora de la fibrinólisis es la plasmina. La formación de plasmina está catalizada endógenamente a partir del plasminógeno por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) a nivel del torrente sanguíneo (Yepes et al., 2004), y por la uroquinasa activadora del plasminógeno (u-PA), a nivel tisular (Mondino et al, 2004). Ambos activadores rompen la unión arginina-valina entre los residuos 560 y 561 de la molécula de plasminógeno, dando lugar a la formación de 2 cadenas de plasmina unidas por 2 puentes disulfuro. La acción principal de la plasmina consiste en fragmentar las moléculas de fibrina que constituyen la malla que estabiliza al coágulo sanguíneo. La acción de la plasmina se inhibe a dos niveles, por un lado se puede reducir su concentración y por otro su actividad. Varias moléculas pueden reducir los niveles de plasmina, como por ejemplo el

inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) que actúa uniéndose tanto a t-PA como a u-PA y facilitando la degradación de la plasmina. Otra molécula que realiza un papel regulador de la fibrinólisis es el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (Bajzar et al., 1995). Esta molécula es activada por la trombina, especialmente en presencia de trombosmodulina, y TAFI elimina residuos de lisina de la molécula de fibrina, impidiendo la unión del t-PA y plasminógeno y por tanto, disminuyendo la síntesis de plasmina y aumentando la resistencia a la degradación del coágulo. Por otra parte se puede inhibir la actividad de la plasmina mediante la unión a moléculas como la alfa-2-antiplasmina o la alfa-2-macroglobulina.



La figura muestra el proceso de la fibrinólisis así como los mecanismos de activación e inhibición de este proceso. Tomado de James L et al, 2007. *Cardiometabolic Risk Syndrome Part V: Fibrinolytic Dysfunction* (www.setma.com/article.cfm?ID=330)

A nivel intravascular, la fibrinólisis comienza con la liberación del t-PA desde el endotelio vascular al torrente sanguíneo. En la superficie del coágulo, tanto el plasminógeno como el t-PA se adhieren a la fibrina, y el plasminógeno sufre un procesamiento para dar lugar a la plasmina, la forma activa del plasminógeno. La plasmina formada en la superficie de la malla de fibrina queda protegida de la acción de sus inhibidores al tener ocupado el centro activo. Sin embargo, la forma circulante libre del t-PA tiene una baja afinidad por el

plasminógeno y además, las pequeñas cantidades de plasmina que se formen serán rápidamente inhibidas por la alfa-2-antiplasmina o alfa-2 macroglobulina. De esta manera, la fibrinólisis se desencadena por la presencia de la fibrina en el coágulo y la actividad del t-PA queda limitada a su superficie (Wiman et al., 1978). La plasmina catalizará la fragmentación de la malla de fibrina en fibrinopéptidos solubles, también llamados productos de la degradación de la fibrina (PDF). Estos péptidos, entre los que se encuentra el dímero D, serán eliminados por la acción de las proteasas de los macrófagos a nivel hepático y renal.

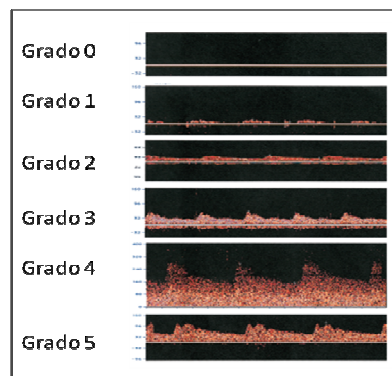
En el proceso fibrinolítico se produce un continuo equilibrio entre la formación de moléculas profibrinolíticas y su inhibición. Así, el PAI-1 neutraliza el exceso de t-PA en la circulación y trata de mantener la malla de fibrina estable. Las plaquetas contribuyen a la estabilización del tapón plaquetario liberando PAI-1 en los lugares de lesión vascular, una vez producida la agregación plaquetaria.

Para asegurar la eficacia de este modelo es necesario que las moléculas de plasminógeno neutralizadas sean reemplazadas en la superficie de fibrina. La propia fibrina parcialmente degradada presenta más zonas de unión al plasminógeno, exponiendo residuos de lisina. Así, nuevas moléculas de plasminógeno se unirán y serán activadas por el t-PA, y dará lugar a un proceso de fibrinólisis progresivamente acelerada (Fleury et al, 1993). Es precisamente en estas nuevas zonas de unión donde actuará el TAFI para inhibir la fibrinólisis (Bajzar et al, 1995).

El objetivo de la administración de rt-PA es la recanalización del vaso ocluído en el menor tiempo posible, para restablecer el flujo sanguíneo en la zona isquémica y salvar el área de penumbra isquémica. La recanalización del vaso ocluído se puede monitorizar mediante el doppler transcraneal (DTC) y dicha monitorización se puede realizar de forma continua mediante la utilización de un dispositivo que fija el transductor a la región temporal del paciente a modo de casco y mantiene el ángulo de insonación constante. Para determinar la presencia de oclusión o recanalización se utilizan los criterios de

la clasificación TIBI (Thrombolysis in Brain Ischemia) (Demchuk et al., 2001). Así, se define la oclusión proximal de la ACM como la ausencia de flujo o la presencia de un mínimo flujo a través de la ACM a una profundidad de insonación entre 45 y 65 mm, acompañado de una inversión del flujo en la arteria cerebral anterior o cerebral posterior ipsilateral.

La figura muestra la escala TIBI de flujo residual determinado mediante doppler transcraneal. Grado 0, ausencia de señal de flujo; Grado 1, mínima onda de flujo sistólico; Grado 2, flujo sistólico aplanado con aparición de flujo diastólico; Grado 3, velocidad media de flujo atenuada >30% comparado con el contralateral; Grado 4 o estenótico, velocidad media de flujo sistólico >30% que el contralateral o signos de turbulencia; Grado 5, flujo normal. (Tomado de Demchuk et al., 2001).



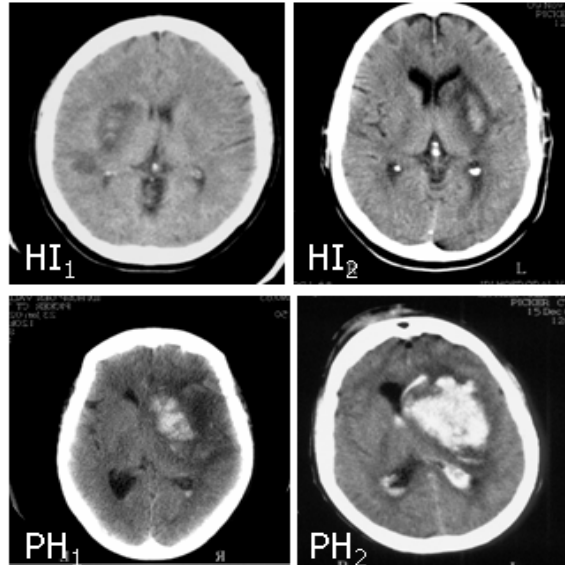
La recanalización del vaso resulta fundamental en el tratamiento del ictus agudo puesto que se ha demostrado que la velocidad de lisis del trombo se relaciona con la mejoría neurológica inicial, el tamaño del infarto y el pronóstico del paciente (Christou et al., 2000; Molina et al., 2001; Alexandrov et al., 2001; Röther et al., 2002). Así, en un estudio en el que se monitorizó de forma continua a una serie de 40 pacientes tratados con rt-PA en las primeras 3 horas, se encontró que el tiempo medio de recanalización era de 45 ± 20 minutos tras la administración del bolus (Alexandrov et al., 2000). Además, se observó que la falta de mejoría clínica se asociaba a la ausencia de recanalización, a la apertura tardía del vaso o a la aparición de una reoclusión. Por otro lado, un 20% de los pacientes experimentó una mejoría brusca durante la infusión del rt-PA que iba acompañada de la disolución del trombo. Más adelante, en otro estudio realizado en 177 pacientes con ictus isquémico en territorio de la ACM que recibieron rt-PA, la recanalización ocurrió en un tiempo medio de $37,3 \pm 35$ minutos tras el bolus de rt-PA y se alcanzó una recanalización completa en el 36% de los pacientes. Sin embargo, en el 40% de los pacientes la ACM permaneció ocluida al final del periodo de observación, que fue de 6 horas. La mayor parte de los pacientes (28,7%)

recanalizaron entre los 180 y 270 minutos tras el inicio de los síntomas (Molina et al., 2004).

1.1.3.4 SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO FIBRINOLÍTICO: LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

La transformación hemorrágica (TH) forma parte de la evolución natural del infarto isquémico. Antes de la introducción de la terapia con rt-PA ya se comprobó cómo, dependiendo de las series estudiadas, hasta el 43% de los pacientes podía presentar algún grado de sangrado en el seno de la zona necrosada, detectable con TC o mediante necropsia (Toni et al., 1996). La mayor parte de este sangrado (89%) eran hemorragias petequiales y por tanto sin repercusión en la situación neurológica del paciente. Este sangrado parecía ser más frecuente en los ictus de etiología cardiembólica de mediano y gran tamaño (>10cc) (Hornig et al., 1993). Sin embargo, pronto se observó que la utilización de fármacos trombolíticos conllevaba un incremento en el sangrado intracraneal y así, la administración de rt-PA intravenoso a la dosis de 0,9 mg/Kg se acompañaba de un porcentaje de TH sintomática del 6,4% (NINDS study group, 1995) en el estudio que precedió a su aprobación por la FDA.

Para identificar el grado de TH utilizamos habitualmente el sistema descrito en el estudio ECASS (Hacke et al., 1995) que comprende los tipos HI-1 (Hemorrhagic infarction-1) como hemorragia petequial, HI-2 como petequias confluentes, PH-1 (Parenchymal hematoma-1) como un hematoma <30% de la zona infartada con escaso efecto masa y PH-2 como hematoma >30% de la zona infartada con efecto masa importante. Además se utilizan los términos PH-r (Parenchymal hematoma-remote) para identificar los sangrados intracraneales alejados de la zona infartada (anexo 2). La TH se detecta normalmente mediante TC pero nuevos métodos, como la RM con secuencias eco de gradiente y la sonografía son también capaces de identificar el sangrado a la cabecera del paciente (Seidel et al., 2009).



La figura muestra la clasificación de la gravedad de la transformación hemorrágica intracraneal tras el ictus isquémico tratado con rt-PA.

El significado clínico de la TH se ha evaluado en numerosas ocasiones y tiene importancia por la relación que guarda con el deterioro neurológico precoz y la situación vital y funcional del paciente a largo plazo. Parece bastante claro que el grado de TH PH-2 se puede asociar a un deterioro neurológico precoz, en las primeras 24 horas, y a una mayor mortalidad y dependencia medida a los 3 meses tras el ictus. (Fiorelli et al., 1999; Berger et al., 2001). A efectos prácticos, consideramos la TH sintomática como aquella que produce un deterioro neurológico precoz, valorado como un incremento de al menos 4 puntos en la escala NIHSS, según fue definida en el estudio ECASS II (Hacke et al., 1998). La TH sintomática tiene consecuencias devastadoras, puesto que hasta el 45% de los pacientes que la presentaron en el estudio NINDS y el 83% en el PROACT-II fallecieron (Khatri et al., 2007).

En una revisión sistemática de los ensayos clínicos realizados con fármacos trombolíticos se confirmó que el riesgo de hemorragia intracraneal sintomática se incrementa claramente tras la fibrinólisis (OR 3,37 IC95% 2,68-4,22) (Wardlaw et al., 2003). En un registro practicado en Canada en 1135 pacientes que habían recibido rt-PA encontraron que el 27% tenían algún grado de TH, aunque sólo fueron sintomáticas en el 4,4% de los casos (Dzialowski et

al., 2007). No obstante, clásicamente se considera que sólo los grados de mayor TH se relacionan con un mal pronóstico a los 3 meses. Llama la atención que en este estudio canadiense observaron cómo los grados HI-2, PH-1 y PH-2 eran todos predictores de mal pronóstico en su serie de pacientes. En cuanto a su frecuencia, es llamativo que las tasas de TH sintomática varían entre los diferentes ensayos clínicos publicados, y oscilan entre el 6,4% del estudio NINDS y el 19,8% del ECASS I (Hacke et al., 1995). Una posible explicación para este hecho es que no hay un claro consenso en la definición de TH sintomática y se han utilizado diferentes criterios para definirla en los ensayos clínicos. De este modo, cuanto más estricta es la definición, el porcentaje de pacientes que la presentan es menor y así, en el SITS-MOST, que sólo contemplaba hemorragias en grado PH-2, medidas entre las 22 y 36 horas postratamiento y claramente asociadas a deterioro neurológico, tan solo el 1,7% de los pacientes desarrolló una TH sintomática (Wahlgren et al., 2007). Además, en ocasiones es complicado atribuir a la TH el empeoramiento del paciente, que puede deberse al crecimiento del infarto y la extensión del edema más que a la aparición de un cierto grado de TH en el seno de la zona infartada o bien tener otras causas no neurológicas como la sepsis o una alteración metabólica.

Puesto que en la actualidad el principal factor limitante de la utilización del rt-PA es el riesgo de TH sintomática, la identificación de los factores predictores del desarrollo de esta complicación resultan fundamentales. La aparición de hipodensidad focal precoz en las imágenes obtenidas mediante TC fue uno de los primeros factores identificados como predictores de la aparición de complicaciones hemorrágicas (Toni et al., 1996). En un análisis secundario del estudio ECASS-II se observó que el uso de fibrinolítico, la presencia de hipodensidad en la TC basal, el nivel de presión arterial sistólica basal, la presencia de insuficiencia cardiaca congestiva y la edad fueron factores predictores de PH (Larrue et al., 2001). También la albuminuria, en muestras de orina recogidas en las 3 primeras horas y considerada como un ratio albúmina-creatinina ≥ 30 mg/g, se encontró que predecía de forma independiente la aparición de TH (OR 7,45; IC95% 2,30-24,16) y de PH1-PH2 (OR 8,30; IC95% 1,77-38.89) (Rodríguez-Yáñez et al., 2006). Recientemente,

Paciaroni y colaboradores, han encontrado en un grupo de 1125 pacientes consecutivos tratados con rt-PA que el 3,2% del total de la serie presentó un PH. La hemorragia fue determinada con un tiempo medio de 5 ± 2 días tras el ictus y el 97,1% de los que sufrieron una PH fallecieron o quedaron con secuelas ($mRS\geq 3$). Los factores que en esta serie se asociaron a la aparición de PH fueron lesiones isquémicas extensas, la etiología cardioembólica, la presencia de niveles elevados de glucosa y el tratamiento trombolítico (Paciaroni et al., 2008). En cuanto a la TH sintomática, los más claros predictores de esta temible complicación en los diferentes ensayos clínicos realizados han sido el tratamiento trombolítico y la dosis del fármaco empleado, el edema objetivado en la TC, la gravedad del ictus y la edad avanzada. (Khatri et al., 2007). Los niveles elevados de glucosa a nivel basal y la presencia de diabetes también se han detectado como predictores de la aparición de TH sintomática, en una serie de 138 pacientes consecutivos tratados con rt-PA en las primeras 3 horas tras el ictus (Demchuk et al., 1999). El papel de la diabetes mellitus se confirmó en una serie de casos en los que se realizó estudio necrópsico (Kerenyi et al., 2006). En un estudio retrospectivo se encontró que las desviaciones del protocolo de tratamiento con rt-PA y los signos precoces de isquemia eran factores que predecían la aparición de TH sintomática de forma independiente (Martí-Fàbregas J et al., 2007).

Aunque el efecto más temido del tratamiento con rt-PA es la TH merece la pena comentar que la seguridad de este fármaco puede estar relacionada con otros factores. A pesar del avance que el uso del rt-PA ha supuesto en el tratamiento de la isquemia cerebral aguda, en los últimos años se ha puesto de manifiesto un posible efecto tóxico de este fármaco. Tanto la plasmina como el rt-PA, ambos proteasas de amplio espectro, podrían ser neurotóxicos si alcanzan el espacio extracelular. En modelos animales se ha descrito que, en casos de infarto extenso con disrupción de la barrera hematoencefálica, parte de este daño podría mediarse por el efecto proteolítico del rt-PA exógeno. Además, el rt-PA parece tener un efecto pleiotrópico a nivel cerebral produciendo vasodilatación, la proteólisis de la subunidad NR1 del receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato), el incremento de la conductancia intracelular de Ca^{++} y la activación de metaloproteinasas, como la MMP-9. Estas vías pueden

contribuir a la excitotoxicidad, empeorar el daño en la barrera hematoencefálica y, por tanto, favorecer el edema y la transformación hemorrágica (Kaur et al., 2004).

1.1.4 PRONÓSTICO DEL ICTUS ISQUÉMICO

1.1.4.1 PRONÓSTICO VITAL

A pesar de los avances experimentados en los últimos años en cuanto al conocimiento fisiopatológico del ictus isquémico y la introducción de mejores protocolos de tratamiento, incluido el rt-PA en la fase aguda, el pronóstico vital y funcional del ictus sigue siendo ominoso.

El ictus constituye en nuestro país la segunda causa de mortalidad por entidades específicas y sigue siendo la primera causa de mortalidad en la mujer (INE, 2007). Se calcula que el 8-12% de los pacientes con ictus isquémicos entre los 45 y los 64 años fallecen en los primeros 30 días tras el episodio (Rosamond et al., 1999) mientras que otro estudio muestra que la mortalidad depende de la franja de edad. Así, fallecen el 9% de los pacientes entre 65 y 74 años, el 13,1% de los pacientes entre 74 y 84 años y el 23 % de los mayores de 85 (Casper et al., 2008). La tasa de mortalidad en el año 2005 en un país occidental como EEUU, se estimó en 46,6 por cada 100.000 personas y se ha demostrado que la tasa de mortalidad ha descendido en el periodo comprendido entre el año 1980 y el 2005, especialmente entre los hombres y los mayores de 65 años (Lloyd-Jones et al., 2009). Se considera que el descenso en la tasa de mortalidad en los últimos años se debe fundamentalmente a la mejora en la detección y tratamiento de la HTA (Luepker et al., 2006). Aproximadamente, el 53% de los fallecimientos tienen lugar fuera del hospital (Lloyd-Jones et al., 2009). En el ictus en general, se ha observado que, al cabo de 1 año tras el episodio agudo, entre el 22 y el 27% de los mayores de 70 años han fallecido y este porcentaje puede ascender hasta el 32% al cabo de 5 años (Lloyd-Jones et al., 2009). Por otra parte, en los primeros ensayos clínicos realizado con el rt-PA, se encontró que la mortalidad al tercer mes tras el ictus oscilaba entre el 17% del grupo tratado con fibrinólisis

y el 21% del grupo control (NINDS, 1995). En posteriores ensayos clínicos se encontró una mortalidad más baja, siendo la mortalidad global del 12,6% en el estudio ECASS II (Hacke et al., 1998).

1.1.4.2 PRONÓSTICO FUNCIONAL

La enfermedad cerebrovascular se sigue considerando la causa principal de discapacidad neurológica en el adulto en los países desarrollados (Lloyd-Jones et al, 2009). El pronóstico funcional de los pacientes con ictus, especialmente en los ensayos clínicos, se determina mediante la utilización de escalas y la más ampliamente utilizada es la escala de Rankin modificada (mRS) (anexo 3). El tiempo de recuperación desde el ictus depende de su gravedad. A los 3 meses tras el episodio agudo, entre el 50-70% de los supervivientes son funcionalmente independientes, entre el 15-30% tienen una incapacidad permanente y el 20% están institucionalizados (Asplund et al., 1998).

Situación Funcional	Porcentaje
Hemiparesia	50%
Necesita ayuda para caminar	30%
Dependientes en las actividades básicas de la vida diaria	26%
Afasia	19%
Síntomas depresivos	35%
Institucionalizados	26%

En la tabla se muestra el estado funcional a los 6 meses del episodio de un grupo de pacientes mayores de 65 años que sufrieron un ictus isquémico (Kelley-Hayes et al., 2003)

Tras el ictus, las mujeres tienden a sufrir un mayor grado de discapacidad que los hombres. En un estudio realizado en Michigan, se aprecia que en el momento del alta el 33% de las mujeres tienen una puntuación en la escala mRS ≥ 4 , en comparación con el 27% de los hombres, mostrando cómo el pronóstico funcional de las mujeres es peor que el de los varones en la

enfermedad cerebrovascular (Lloyd-Jones et al., 2009). No obstante, todavía es controvertido la influencia que el sexo puede tener en el manejo y en consecuencia, en el estado funcional de los pacientes a medio y largo plazo, por lo que se están realizando numerosos estudios para determinar esta cuestión.

1.1.4.3 FACTORES PRONÓSTICOS

Se han intentado múltiples aproximaciones utilizando métodos estadísticos para predecir el pronóstico funcional y vital de los pacientes con ictus por medio de variables clínicas y radiológicas, principalmente recogidas en el periodo de hospitalización. Un modelo que incluía 6 variables clínicas (edad, vivir solo y mRS previo al ictus, la capacidad verbal medida mediante la escala de coma de Glasgow, la fuerza en las extremidades superiores y la independencia para caminar) mostró una gran precisión para predecir la supervivencia y la independencia de los pacientes al cabo de 6 meses o 1 año tras el ictus (área bajo la curva ROC= $0,84 \pm 0,01$) (Counsel et al., 2004; Counsel et al., 2002) y fue validado en cohortes independientes. En un estudio recientemente publicado (Kissela et al., 2009), los factores que predicen un peor estado funcional al tercer mes son la edad avanzada, la diabetes, la leucoaraiosis extensa, el grado de afectación neurológica del ictus así como la puntuación del mRS antes del ictus y en el momento del alta. Entre las variables que predicen el estado funcional a largo plazo (4 años) destacan la presencia de un ictus previo y el desarrollo de complicaciones infecciosas en los 3 primeros meses tras el ictus. En otro estudio, la presión arterial, en concreto la presión sistólica > 180 mm Hg en las primeras 6 horas y la presión diastólica media descendida entre las 6 y las 24 horas tras el ictus se asociaron de forma independiente con un peor pronóstico al tercer mes (Armario et al., 2008). Al tomar como punto inicial de referencia del pronóstico a largo plazo el tercer mes tras el ictus isquémico, Eriksson y colaboradores encontraron en un grupo de casi 16.000 pacientes, que el principal determinante del mal pronóstico a largo plazo era el peor estado funcional al tercer mes, medido mediante la escala mRS, seguido del sexo masculino, la edad elevada, la diabetes, el hábito tabáquico, el tratamiento hipertensivo al inicio del ictus, la fibrilación

auricular y la presencia de depresión (Eriksson et al., 2008). A pesar de los esfuerzos realizados, algunos de estos factores o modelos pueden resultar útiles para estratificar el riesgo en la fase hiperaguda en pacientes que van a ser incluidos en un ensayo clínico (Lewis et al., 2008) pero aún estamos lejos de utilizar estas herramientas para predecir el riesgo de forma individual en la práctica clínica y no es posible utilizar esta información para guiar el manejo del paciente o para ofrecer esta información a los pacientes y familiares en las primeras horas o días tras el inicio de los síntomas.

1.2 LOS BIOMARCADORES EN EL ICTUS

1.2.1 UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES EN EL ICTUS

En los últimos años la utilización de biomarcadores plasmáticos se ha extendido en la práctica clínica de numerosas disciplinas médicas. Un biomarcador se define como un parámetro biológico, que puede medirse objetivamente, generalmente en un fluido orgánico, y que sirve como indicador de un proceso fisiológico, patológico o de respuesta farmacológica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Los biomarcadores complementan el proceso diagnóstico, ayudan a tomar decisiones terapéuticas y aportan valiosa información pronóstica en la práctica médica. Diversas situaciones, como la instauración de un tratamiento hipolipemiante en función del nivel plasmático de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el diagnóstico de un infarto de miocardio mediante la determinación del perfil temporal de las troponinas, la clasificación etiológica de la disnea utilizando el péptido natriurético cerebral (BNP) o la exclusión de un tromboembolismo pulmonar midiendo el D-dímero, ilustran la utilidad que este tipo de técnicas tienen en la toma de decisiones médicas. Afortunadamente estas aproximaciones se están empezando a emplear también en el campo de la patología neurovascular y sin duda aportarán información muy valiosa a la obtenida mediante la anamnesis, el examen físico y las pruebas diagnósticas convencionales.

En el caso del ictus isquémico, la identificación de diferentes elementos que participan en la cascada isquémica o en los eventos moleculares

subsiguientes podrían ser de gran utilidad como biomarcadores en el manejo de estos pacientes. La principal dificultad para utilizar estas moléculas radica en que gran parte de estos procesos tienen lugar en los primeros minutos tras la oclusión vascular y, por tanto, difícilmente podemos determinarlos en la práctica. Sin embargo, otros fenómenos posteriores, como la respuesta inflamatoria, la activación del sistema de la coagulación-fibrinólisis, la excitotoxicidad o, incluso, procesos más tardíos, como la apoptosis, juegan un papel fundamental en la isquemia cerebral y pueden convertirse en fuente de potenciales biomarcadores.

A nivel práctico, los biomarcadores pueden ayudarnos en diferentes etapas, desde la identificación de la enfermedad cerebrovascular aguda, la clasificación de esta en diferentes subtipos (isquémico vs. hemorrágico) o en diferentes grupos etiológicos, hasta el manejo del tratamiento fibrinolítico o el establecimiento de un pronóstico funcional en el paciente con ictus. Además de ser potenciales herramientas en el ámbito puramente asistencial, los biomarcadores pueden tener un papel muy importante en el diseño y realización de ensayos clínicos, ayudando a un mejor fenotipado de los pacientes y por tanto mejorando el rendimiento de este tipo de estudios experimentales. En cuanto a las cualidades teóricas que debe tener un biomarcador que pueda resultar útil en la práctica clínica se resumen en la siguiente tabla.

UTILIDAD DEL BIOMARCADOR		CARACTERÍSTICAS
DIAGNÓSTICO DEL ICTUS	Alta sensibilidad	Debe detectarse incluso con volúmenes de infarto pequeños, como los infartos lacunares
	Alta especificidad	De forma ideal, debería ser específico de la isquemia cerebral
	Rápidamente detectable en un fluido accesible	De forma ideal, debería detectarse rápidamente (<1hora) tras el comienzo de los síntomas
	Diferenciar ictus frente a mimics	Capaz de diferenciar entre el ictus isquémico y las entidades que lo simulan en urgencias
COMPLICACIONES DEL ICTUS	Infarto Maligno ACM	Capaz de identificar pacientes con riesgo elevado de evolucionar hacia un infarto maligno de la ACM
TRATAMIENTO DEL ICTUS	Transformación hemorrágica	Capaz de identificar pacientes en riesgo de sufrir una transformación hemorrágica, principalmente sintomática, tras el tratamiento con t-PA.
	Recanalización	Capaz de correlacionarse con la apertura del vaso tras el tratamiento con t-PA
PRONÓSTICO DEL ICTUS	Correlación con el volumen del infarto	Capaz de correlacionarse con el volumen del infarto medido por técnicas de TAC o RM
	Correlación con el estado funcional	Capaz de correlacionarse con el estado funcional del paciente medido con escalas como la mRS al tercer mes

En la tabla se resumen las cualidades teóricas que debe tener un buen biomarcador ACM: arteria cerebral media. Adaptado de Dassan et al, 2009.

En las últimas décadas se ha progresado mucho en el descubrimiento y validación de biomarcadores que ayuden en todas estas etapas del manejo de la enfermedad cerebrovascular. En la siguiente tabla se muestran los principales biomarcadores que, hasta la fecha, han presentado mejores resultados en los estudios publicados.

Biomarcador	Comparación	n	Sensibilidad	Especificidad
DIAGNÓSTICO ICTUS ISQUÉMICO				
NMDA-R anticuerpo	IS vs controles, < 3h	304	97	98
Panel 4 biomarcadores	IS vs controles, < 24h	222	90	90
Panel 5 biomarcadores	IS vs mimics, <6h	130	81	70
Panel 4 biomarcadores	IS vs mimics, <24h	654	85	34
PARK7	IS vs otros pacientes	787	58	90
NDKA	IS vs otros pacientes	787	67	90
DIAGNÓSTICO DE ICTUS HEMORRÁGICO				
GFAP	HIC vs IS, <6h	135	79	98
APO C-III	HIC vs IS, <6h	42	94	87
TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA TRAS FIBRINOLISIS				
MMP-9	PH vs resto	41	100	78
MMP-9	HI-2, PH vs resto	134	81	88
c-Fn	HI-2, PH vs resto	134	100	96
S100B	PH-2 vs resto	275	46	82
PAI-1, TAFI	TH sintomática vs resto	77	75	98

En la tabla se resumen los principales biomarcadores con mejores resultados publicados hasta la fecha. Panel 4 biomarcadores incluye S100B, vCAM, MMP-9, von Willebrand factor; Panel 5 biomarcadores incluye BNP, C-reactive protein, Dímero D, MMP-9, y S100B; segundo Panel 4 biomarcadores incluye Dímero D, BNP, MMP-9 y S100B. NMDA-R: receptor de N-metil D-aspartato; IS: ictus isquémico; PARK7: proteína Parkinson Disease (autosomal recessive, early onset) 7; NDKA: Nucleósido Difosfato Kinasa A; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; HIC: hemorragia intracraneal; APO C-III: apolipoproteína C-III; MMP-9: metaloproteínasa 9; PH transformación hemorrágica-hematoma parenquimatoso; HI-2: transformación hemorrágica con petequias confluentes; c-Fn: fibronectina 1; S100B: proteína ligadora de calcio beta; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina; TH: transformación hemorrágica. Adaptado de Foerch et al, 2009.

1.2.2 BIOMARCADORES Y DIAGNÓSTICO DEL ICTUS

El empleo de biomarcadores puede contribuir a mejorar el proceso diagnóstico del ictus. El diagnóstico inicial de la enfermedad cerebrovascular aguda se realiza en los primeros momentos de una forma meramente clínica. La aparición brusca de unos determinados síntomas y signos focales neurológicos hace sospechar que el paciente puede estar sufriendo un ictus y se considera esta situación como una emergencia médica. Puesto que la

administración de rt-PA en las primeras 4,5 horas y la admisión en una unidad de ictus son las medidas que actualmente ofrecen mejores resultados, el paciente debe ser trasladado de inmediato a un centro hospitalario con posibilidades de tratamiento del ictus. Así, en el centro se confirmará la naturaleza vascular del cuadro, se establecerá su origen isquémico o hemorrágico y finalmente, se instaurará el tratamiento adecuado de forma precoz.

Sin embargo, el manejo y tratamiento farmacológico de estos pacientes está limitado en gran medida por los errores en el diagnóstico. A pesar del gran avance en el conocimiento general de la enfermedad cerebrovascular, llama la atención que entre un 1,9% (García-Moncó et al., 2002) y un 19-31% (Libman et al., 1996; Hand et al., 2006) de los pacientes que reciben inicialmente el diagnóstico de ictus presentan en realidad otras enfermedades, como crisis epilépticas parciales, auras migrañosas o tumores cerebrales que simulan la enfermedad cerebrovascular. En un primer momento se podría pensar que lo más sencillo sería enviar a un centro de referencia a todos los pacientes con un déficit neurológico brusco para que todos aquellos con enfermedad cerebrovascular se beneficien del tratamiento. Sin embargo, esta estrategia puede resultar costosa a largo plazo y parece más razonable encontrar métodos que permitan diferenciar los ictus de los mimics de forma rápida y precisa y, así, eviten traslados de pacientes que serán evaluados por especialistas y sometidos a pruebas innecesarias. Algunas aproximaciones clínicas, como el uso del test Face-Arm-Speech (cara-brazo-lenguaje) pueden ayudar a la identificación de estos pacientes. Este test fue probado en un estudio realizado con personal paramédico y el porcentaje de mimics que eran enviados al hospital resultaba menor que en otras series aunque todavía era elevado (79%) (Harbison et al., 2003). Es evidente que el uso de biomarcadores que aporten información a la que obtenemos de los datos clínicos sería de gran utilidad para el manejo de estos pacientes.

Las características de un biomarcador que sea útil para el diagnóstico del ictus dependerán del nivel de atención sanitaria en el que lo utilicemos y de la finalidad que se persiga. Así, en un primer momento, cuando el paciente es

atendido antes del traslado al hospital, el empleo de un test muy sensible nos asegurará que los pacientes con ictus sean trasladados a un centro sanitario. Por otra parte, hay que tener en cuenta que, el hecho de que el paciente sea evaluado en un servicio de urgencias de un hospital terciario no elimina la posibilidad de llegar a un diagnóstico equivocado. En un trabajo publicado por Scott y colaboradores, se mostró cómo el 4% (IC95% 1%-8%) de una serie de 151 pacientes que fueron tratados con trombolisis, recibieron finalmente un diagnóstico diferente al de ictus isquémico (Scott et al., 2003). Así pues, para el neurólogo también sería interesante disponer de biomarcadores, en este caso con alta especificidad para la enfermedad cerebral de origen vascular, que ayudasen a guiar la decisión del tratamiento fibrinolítico o el ingreso del paciente en una unidad de ictus.

En el caso del AIT, la utilización de biomarcadores validados tendría un valor añadido incuestionable en la práctica clínica puesto que en muchas ocasiones la sintomatología clínica que sufre el paciente no ha sido presenciada por el médico y la interpretación depende exclusivamente de la amnesia. Otras veces los síntomas y signos son difíciles de distinguir de otros procesos neurológicos, como una crisis epiléptica parcial o el aura de una migraña. y un test con elevada especificidad nos permitirá evitar el traslado urgente innecesario de pacientes, con el consiguiente ahorro en los costes que este hecho genera. Sin embargo, el estudio de los pacientes con AIT excede los propósitos de esta tesis y nos hemos centrado exclusivamente en el estudio de la enfermedad cerebrovascular establecida.

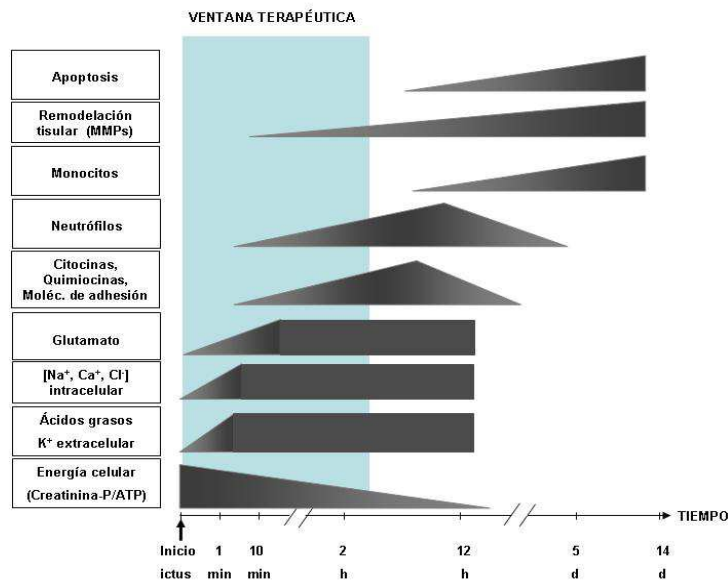
Otra herramienta de gran utilidad serían los biomarcadores que permitiesen diferenciar entre el ictus isquémico y el hemorrágico. Puesto que su manejo es diferente y la ventana terapéutica del ictus isquémico es estrecha, de tan sólo 4,5 horas, el conocimiento precoz de la naturaleza isquémica del ictus, especialmente en una fase prehospitalaria, ayudaría sin duda a coordinar mejor la atención al paciente en estos momentos. Es de sobra conocido que en otras enfermedades de carácter vascular agudo, como el síndrome coronario agudo, se puede iniciar el tratamiento farmacológico de forma extrahospitalaria, haciendo que este resulte más eficaz. En el caso de

ictus, la diferenciación de la naturaleza isquémica o hemorrágica del evento, permitiría, por ejemplo, durante el traslado del paciente al hospital iniciar un tratamiento más intensivo de la presión arterial, que favorecería a los pacientes con ictus hemorrágicos. Además, facilitaría la preparación de los profesionales que en el servicio de urgencias podrían ir preparando los diferentes protocolos de manejo de los pacientes con ictus según su naturaleza.

Una vez detectado el ictus, resulta fundamental conocer el proceso etiológico que lo ha producido, para establecer una correcta prevención secundaria. Sin embargo, en la práctica es difícil clasificar adecuadamente a todos los pacientes y así, cuando utilizamos la clasificación etiológica TOAST, un porcentaje cercano al 25-30% de pacientes quedan con un diagnóstico indeterminado. El empleo de biomarcadores que aportasen información etiológica permitiría reducir esta proporción de pacientes, facilitando así la instauración de un tratamiento secundario más adecuado.

1.2.2.1 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON EL DIAGNÓSTICO DEL ICTUS

El hallazgo de moléculas que puedan utilizarse como biomarcadores en el ictus isquémico pasa por el estudio de los eventos moleculares y celulares que tienen lugar durante la isquemia cerebral. El ictus se caracteriza por un cese del flujo sanguíneo que altera el equilibrio de la unidad neurovascular e inicia una serie de procesos conocidos como cascada isquémica.



En la imagen se observa el perfil temporal de los cambios moleculares y celulares implicados en el proceso de isquemia cerebral. Imagen tomada de García-Berrocoso T et al, 2009.

Estos procesos conducirán, si el flujo no se reestablece, a la formación de un núcleo de tejido necrótico conocido como core del infarto, rodeado de otra zona disfuncional pero potencialmente recuperable conocida como penumbra isquémica. Otros fenómenos como la inflamación, la apoptosis o el estrés oxidativo, que ocurren más tardíamente, son también responsables del daño producido en la isquemia cerebral y por tanto las moléculas implicadas en estas vías serían potenciales biomarcadores. En esta línea, varias moléculas se han explorado en modelos experimentales y en pacientes con ictus.

Las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, LFA-1) están implicadas en la infiltración de leucocitos al tejido cerebral, paso inicial de la respuesta inflamatoria. Varios estudios han valorado los niveles de estas moléculas en muestras de sangre periférica tomadas de 12 a 72 horas tras el inicio del ictus aunque los resultados no han sido homogéneos. La forma soluble de la molécula de adhesión intercelular (sICAM-1) medida a las 24 horas tras el ictus se relaciona con el deterioro neurológico (Wang et al., 2006) y las concentraciones de sVCAM-1 (forma soluble de la molécula de adhesión

a la célula vascular) y sELAM-1 (forma soluble de la molécula de adhesión leucocito endotelial) aumentan durante los cinco primeros días tras el evento isquémico (Blann et al., 1999).

La expresión local de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y quimiotácticas (IL-8, MCP-1) promueve el reclutamiento y la migración de neutrófilos y macrófagos a la zona de lesión tisular. Así, se han asociado diversas citocinas pro-inflamatorias, como la interleucina IL-1 y el factor de necrosis tumoral TNF- α , con un mayor daño cerebral. El TNF- α se encuentra sobreexpresado en parénquima cerebral de pacientes con ictus, y aparece primero en el core del infarto y después en áreas peri-infarto (Sarainen et al., 2001). Además, la producción de otra citocina, la IL-6, se ha relacionado con el tamaño del infarto (Rallidis et al., 2006). Por otro lado, un estudio de la expresión del RNA mensajero (mRNA) de IL-1 β en células periféricas mononucleares mostró un incremento en la fase aguda del ictus, con posterior normalización, correlacionándose con el grado de la afectación neurológica (Kostulas et al., 1999).

Por otro lado, las citocinas anti-inflamatorias se relacionan con un efecto neuroprotector, siendo especialmente importante su función en la zona de penumbra. El antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra) ha demostrado proteger frente al daño isquémico cerebral en modelos animales (Clark et al, 2008) y está elevado en el plasma de los pacientes en la primera semana tras el ictus (Beamer et al., 1995). También el factor de crecimiento tisular (TGF)- β 1 y su mRNA han sido detectados en tejido cerebral tras el ictus, especialmente en los márgenes del infarto (Krupinski et al., 1996). El papel neuroprotector de la IL-10, una citocina anti-inflamatoria englobada en la respuesta Th2, se ha observado en isquemia cerebral focal en modelos experimentales. Se ha descrito que los sujetos con baja producción de esta citocina, tienen un mayor riesgo de padecer un ictus (van Exel et al., 2002). Paralelamente, se han encontrado concentraciones elevadas de IL-10 en el LCR tras la fase aguda del ictus (Tarkowski et al, 1997), así como el incremento de células secretoras de IL-10 (Pelidou et al, 1999) indicando la puesta en marcha de una reacción anti-inflamatoria en las fases precoces del ictus.

Las quimiocinas, responsables del reclutamiento de leucocitos, también se elevan en sangre periférica tras el ictus isquémico. Existe un incremento de IL-8 en el plasma y especialmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ictus, lo que sugiere que una parte importante de su producción proviene del sistema nervioso central. Las concentraciones de IL-8 en LCR difieren entre pacientes con grandes infartos afectando sustancia gris y pequeños infartos de la sustancia blanca. Parece que en los primeros podría tener un papel deletéreo y en los segundos, neuroprotector (Tarkowski et al., 1997). La MCP (proteína quimiotáctica de monocitos)-1 tiene un papel destacado en la infiltración del tejido cerebral por monocitos/macrófagos y se ha descrito su incremento en LCR durante la fase aguda del ictus (Losy et al., 2001). Estas moléculas podrían ser potenciales biomarcadores en el diagnóstico del ictus, aunque sin duda, es necesario profundizar en su estudio.

Aunque en los estudios iniciales generalmente se ha evaluado el papel de una única molécula como biomarcador diagnóstico, en los últimos años se ha propuesto que la determinación de varias moléculas al mismo tiempo, en un panel de biomarcadores, mejoraría el rendimiento y, en este sentido, se han publicado varios estudios. Reynolds y colaboradores estudiaron en una serie de 223 pacientes con ictus, incluyendo 82 ictus isquémicos, comparada con 214 voluntarios sanos, un grupo de 50 marcadores en el suero. Propusieron un modelo en el que, cuando 3 o más moléculas de un grupo de proteínas (S100B, el factor de crecimiento neurotrófico tipo B, el factor von Willebrand, MMP9 o la proteína quimiotáctica de monocitos-1) se encontraban por encima de un punto de corte, la sensibilidad para predecir un ictus isquémico era de un 92% y la especificidad de un 93%, en las primeras 6 horas de iniciados los síntomas (Reynolds et al., 2003). Otro grupo estudió 130 pacientes que fueron atendidos en las primeras 6 horas tras el ictus isquémico, de los cuales, 41 presentaron un ictus isquémico confirmado posteriormente. Un modelo incluyendo al péptido atrial natriurético (BNP), la proteína C reactiva (CRP), D-dímero, MMP-9 y S100B presentó una sensibilidad del 81% y una especificidad

del 70% para el diagnóstico de ictus isquémico (Laskowitz et al., 2007). Basándose en estos resultados se decidió evaluar, en un estudio prospectivo multicéntrico el valor de un panel de biomarcadores, incluyendo S100B, D-dímero, BNP y MMP9, durante un periodo de 3 años. Sin embargo la precisión del panel (sensibilidad 86%; especificidad 37%) no fue suficiente para recomendar su uso en la práctica clínica habitual (Laskowitz et al., 2009).

1.2.2.2 LA CASPASA 3

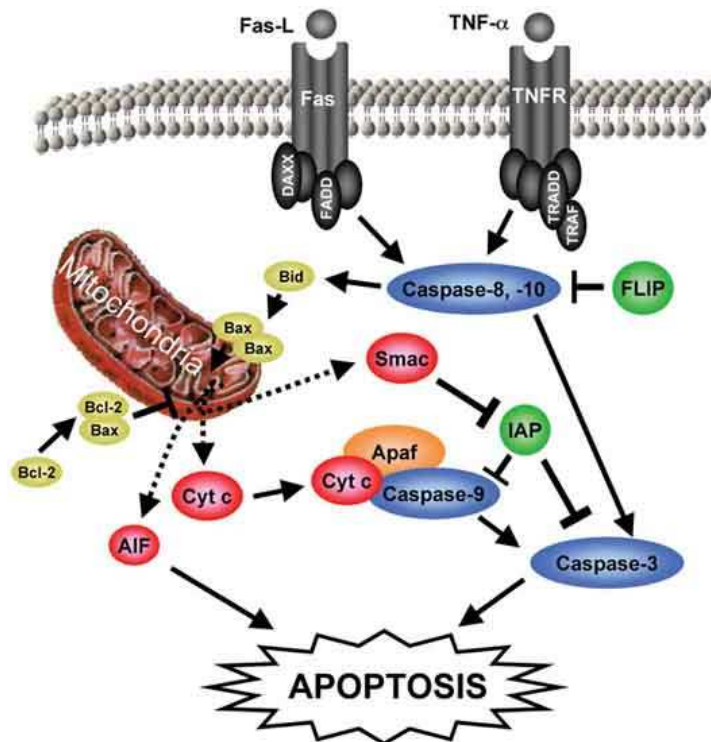
La caspasa 3 es una proteína perteneciente a las caspasas, una familia de cisteín-aspártico-proteasas que desempeñan diversas funciones en los procesos apoptóticos, necróticos e inflamatorios. Las caspasas presentan una forma inactiva y sufren una escisión a nivel de los residuos de aspartato para formar dos subunidades, una corta y otra larga, que forman un dímero y constituyen así la forma activa de la enzima. La activación secuencial de dichas proteínas contribuye de forma decisiva a la muerte celular programada. La caspasa 3 puede ser activada por las caspasas 8, 9 y 10 y ella, a su vez, activa a las caspasas 6, 7 y 9.

A los pocos minutos de comenzar la isquemia cerebral, la zona del parénquima con la restricción de flujo sanguíneo más severa sufrirá un proceso de necrosis, formándose el “core” del infarto. La región de parénquima adyacente, conocida como “penumbra isquémica”, aunque funcionalmente silente permanece metabólicamente activa y es, por tanto, potencialmente salvable si se restablece el flujo sanguíneo. En esta zona las neuronas pueden experimentar procesos de apoptosis después de varias horas o incluso días de iniciada la isquemia (Broughton et al., 2009). Los procesos de apoptosis se producen a través de dos vías moleculares principales, la vía intrínseca, desencadenada por la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma y la extrínseca, que se activa a través de receptores de membrana.

La oclusión vascular pone en marcha una serie de fenómenos moleculares conocidos como “cascada isquémica”. Así, la disminución del aporte de oxígeno y glucosa produce una deplección de ATP, que se manifiesta en un

fallo del mantenimiento de los gradientes iónicos en las membranas neuronales y, por tanto, en una pérdida del potencial de membrana (Dirnagl et al., 1999). Esta despolarización favorece la activación de canales de calcio voltaje-dependientes y la liberación de aminoácidos excitadores, como el glutamato. El glutamato, a su vez, activa los canales iónicos asociados a receptores NMDA y AMPA, e incrementa el paso de calcio al citosol (Mergenthaler et al., 2004). El acúmulo de calcio en el citoplasma pone en marcha diversos mecanismos deletéreos para la célula, incluyendo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Dirnagl et al., 1999). Las calpaínas activadas por el incremento de Ca^{2+} producen cambios de conformación y fragmentación de una serie de proteínas pertenecientes en su mayor parte a la familia Bcl-2 (Culmsee et al., 2005). A su vez, estas inducen la liberación de una serie de proteínas proapoptóticas, entre las que destaca el citocromo c, desde la mitocondria al citosol (Elmore et al., 2007). El citocromo c forma un complejo con Apaf-1 y la pro-caspasa 9, conocido como apoptosoma, que conduce a la activación sucesiva de las caspasas 9 y 3 (Sugawara et al., 2004). La caspasa 3 inactiva numerosas proteínas, entre ellas la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) (Endres et al., 1997), lo que tendrá un efecto deletéreo en el DNA. En respuesta a este daño el factor de transcripción supresor tumoral p53 para el ciclo celular y finalmente se produce la muerte celular apoptótica (Martín-Villalba et al., 1999).

Por otro lado, la vía extrínseca se inicia con la activación de unos receptores de la membrana plasmática pertenecientes a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), e incluye a TNFR-1, Fas y p75 (Loh et al., 2006). La unión de Fas ligando (FasL) con su receptor Fas pondrá en marcha la vía extrínseca, al formar un complejo con la proteína FADD y la pro-caspasa 8 (Love et al., 2003). Una vez activada, la caspasa 8 en su forma activa es liberada del complejo y conducirá a la activación de la caspasa 3, bien de forma directa o bien a través de la vía del citocromo c (Broughton et al., 2009).



La figura muestra de forma esquemática la activación de la cascada de las caspasas que conducen a la apoptosis celular. Tomado de Aurelian, 2005.

Diversos experimentos han demostrado que tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis se activan tras la isquemia cerebral y la caspasa 3 se ha identificado como un mediador clave en este proceso en modelos animales de isquemia cerebral. Por ejemplo, se ha encontrado un incremento del mRNA de la caspasa 3 en el cerebro de ratas tan sólo 1 hora tras el inicio de una isquemia focal (Asahi et al., 1997) y se ha detectado caspasa-3 en el cerebro de ratones sometidos a una isquemia focal transitoria durante la fase de reperfusión (Namura et al., 1998). Por otra parte, en modelos experimentales de isquemia se ha mostrado cómo la inhibición farmacológica de las caspasas tiene un efecto neuroprotector (Endres et al, 1998; Ma et al, 1998; Mouw et al, 2002; Carloni et al, 2009) y el mismo efecto se observa en ratones deficientes para el gen de la caspasa 3 (Le et al., 2002). Además, de forma muy prometedora se ha publicado que el tratamiento con inhibidores de las caspasas resulta protector cuando se administra hasta las 9 horas tras el inicio de una isquemia focal transitoria (Fink et al., 1998). Estos estudios sugieren que las caspasas pueden ser una diana terapéutica en el ictus

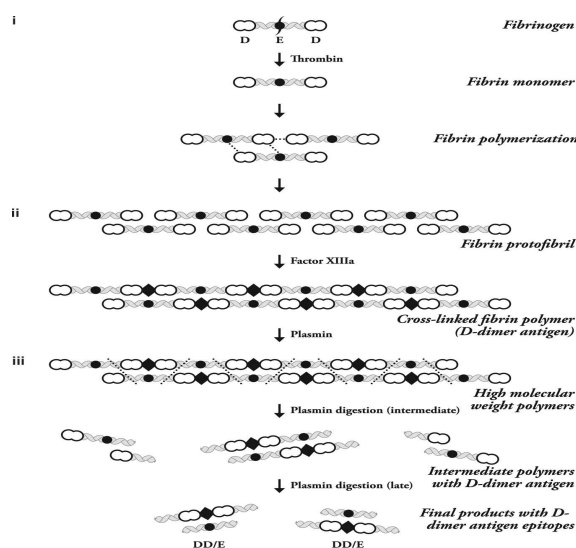
isquémico. Es interesante comentar que la apoptosis tras la isquemia cerebral no se limita a las neuronas y, aunque en menor medida, también se ha descrito en otras células como astrocitos (Krupinski et al., 2000; Chen et al., 1997), microglía (Krupinski et al., 2000) e incluso se postula que podría suceder en células endoteliales (Rodríguez-Yañez et al., 2006).

En humanos también se ha encontrado una sobreexpresión de caspasa 3 tras la isquemia cerebral (Rami et al., 2003). Recientemente se ha descrito que el incremento en la actividad de la caspasa 3 determinado en el parénquima cerebral a las 24 horas del inicio de la isquemia se relaciona con la extensión de la lesión observada en las secuencias de difusión (DWI) de la resonancia magnética en un modelo murino de encefalopatía isquémica neonatal (Wendland et al., 2008). Así mismo, en humanos se observó que los niveles plasmáticos de caspasa 3 a las 24 horas de iniciarse un ictus isquémico se correlacionaban con el crecimiento del infarto, medido en secuencias de difusión en la resonancia magnética, y con la situación funcional del paciente (Rosell et al., 2008).

1.2.2.3 DÍMERO D

Los sistemas de la coagulación y de la fibrinólisis están en constante equilibrio con el objetivo de intentar mantener la integridad y funciones del sistema vascular. A grandes rasgos, la activación secuencial de los numerosos factores que constituyen la cascada de la coagulación conduce a la formación de fibrina, molécula esencial para la estabilización del coágulo. Los monómeros de fibrina polimerizan y dan lugar a las protofibrillas, que se mantienen unidas por medio de enlaces no covalentes (Fowler et al., 1981; Adam et al., 2009). A continuación, el factor XIIIa, activado por la trombina, ayuda a establecer enlaces covalentes entre residuos de lisina y glutamina de los monómeros de fibrina y así, da lugar a la fibrina ligada ("cross-linked"). De forma paralela, la síntesis de fibrina pone también en marcha el sistema fibrinolítico que, gracias a la acción de la plasmina, conducirá a la ruptura de la malla de fibrina y dará lugar a diferentes productos de degradación de la fibrina (Medved et al., 2003). Como consecuencia de la acción de la plasmina sobre la fibrina, queda

expuesto un epítipo antigénico llamado dímero D (DD), el cual forma parte de estos productos de degradación de la fibrina que se pueden detectar en sangre con un amplio rango de pesos moleculares (Gaffney et al., 2001). Este epítipo sólo se encuentra en los fragmentos que proceden de la fibrina ligada y puede determinarse en plasma mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (Dempfle et al., 2005). El nivel del DD se considera un reflejo de la actividad global de formación y lisis de coágulos *in vivo* puesto que no puede generarse *in vitro*.



La figura muestra de forma esquemática el proceso de síntesis y degradación de la malla de fibrina y como consecuencia, la obtención de los productos de degradación de la fibrina, entre los que se encuentra el dímero D. Tomado de Adam et al., 2009.

El DD se ha utilizado ampliamente en la clínica como biomarcador en el diagnóstico del tromboembolismo pulmonar (TEP). Las concentraciones bajas de DD tienen un elevado valor predictivo negativo, por lo que ayudan a descartar esta patología y en la última década se ha incorporado la determinación del DD a los algoritmos diagnósticos del TEP (Wakai et al., 2003; Adams et al., 2001; Wells et al., 2001). Aunque su asociación no se ha establecido tan claramente como en el TEP, el DD también se ha planteado como un test de gran utilidad en el diagnóstico de la trombosis venosa profunda (TVP) y, en este sentido, un nivel de DD bajo excluiría la presencia de una TVP en los pacientes de bajo riesgo (Lennox et al., 1999).

En cuanto a la enfermedad cerebrovascular aguda, cabe destacar que en los casos de trombosis venosa cerebral (TVC), se han descrito resultados dispares. Mientras que en un estudio realizado en 73 pacientes con menos de 30 días de evolución clínica, los niveles bajos de DD no permitían descartar este diagnóstico (Crassard et al., 2005), otro estudio mostró que utilizando un punto de corte de 500 ng/mL de DD, el valor predictivo negativo resultaba muy elevado (95%) en una serie de 54 pacientes y por tanto podría resultar útil para descartar la TVC (Lalive et al., 2003). Por otro lado, en el ictus isquémico se ha estudiado el valor del DD en varias ocasiones. Barber y colaboradores mostraron que el DD estaba elevado en los pacientes con ictus isquémico que desarrollaban un deterioro precoz comparado con aquellos pacientes que no se deterioraban (443 vs. 194 ng/mL; $P < 0,001$) y en un modelo de regresión logística, sólo el nivel de presión arterial medio elevado y el DD elevado predecían la mala evolución clínica de los pacientes (Barber et al., 2004). Además, el DD puede ser de utilidad para definir la etiología del ictus isquémico y así, en un estudio que incluyó una cohorte de 707 pacientes se observó que el DD $> 0,96 \mu\text{g/mL}$ era un factor asociado de forma independiente con el ictus de etiología cardioembólica (OR 2,2 IC95% 1,4-3,7; $P = 0,001$) junto con el péptido natriurético cerebral (BNP) $> 76 \text{ pg/mL}$ (OR 2,3 IC95% 1,4-3,7; $P = 0,001$) (Montaner et al., 2008). Esta asociación entre el nivel elevado de DD y la etiología cardioembólica del ictus isquémico ha sido recientemente corroborada por Isenegger y colaboradores (Isenegger et al., 2010).

En cuanto al tratamiento fibrinolítico, Skoloudík y colaboradores observaron que tras la administración de rt-PA se produce un pico de DD a las 6 horas del inicio del ictus y que, igualmente, la sonotrombolisis también mostraba una tendencia a incrementar los niveles de DD (Skoloudík et al., 2009). De forma interesante Meng y colaboradores describen el perfil temporal del DD y de los fragmentos de la protrombina (1+2) en una serie de pacientes con ictus isquémico que reciben tratamiento con urokinasa y observan cómo los pacientes que recanalizan presentan un pico plasmático más temprano (3 horas), elevado y sostenido de DD que los que no recanalizan, que tienen un pico más tardío (6 horas) y de menor cuantía. Por otro lado, los fragmentos de la protrombina (1+2) comienzan a descender a las 2 horas para alcanzar los

niveles basales en torno a las 24 horas tras la infusión del fibrinolítico en los respondedores, mientras que en los pacientes que no recanalizan estos fragmentos alcanzan un pico a las 3 horas y se mantienen elevados durante una media de 40 horas (Meng et al., 2009). Además, en un estudio que evaluó el valor pronóstico de 16 biomarcadores determinados en las primeras 24 horas tras el ictus isquémico en un grupo de 180 pacientes, encontraron que sólo el nivel elevado de DD y de la proteína C reactiva se asociaban con mal pronóstico tras aplicar un modelo de regresión logística (Welsh et al., 2009). En relación al valor del DD como predictor de recurrencias, un trabajo que determinó el nivel de DD en 167 pacientes consecutivos con un accidente isquémico transitorio (AIT) no encontró relación entre el nivel de DD y la probabilidad de sufrir un nuevo evento vascular o muerte en un plazo de 3 meses desde el AIT (Cucchiara et al., 2009). Sin embargo, Kang y colaboradores encontraron que la concentración elevada de DD, medida en las primeras 24 horas tras el inicio de la isquemia, se asociaba de forma independiente con la aparición de nuevas lesiones isquémicas detectadas mediante las técnicas de difusión en la resonancia magnética (Kang et al., 2009).

En el ictus hemorrágico varios trabajos describen cómo el nivel de DD se eleva en las primeras horas tras el sangrado. Así, Fuji y colaboradores realizaron un estudio en 358 pacientes con hemorragia intraparenquimatosa en los que se extraía sangre en las primeras 6 horas tras el inicio de la clínica y observaron que tanto los niveles del complejo trombina-antitrombina, como del complejo plasmina-antiplasmina y el DD se encontraban elevados respecto a los controles sanos, como reflejo de la activación del sistema hemostático *in vivo*. Además, estos autores encontraron que los niveles estaban más elevados en los pacientes con invasión ventricular de la hemorragia o componente subaracnoideo, es decir, con una gravedad mayor (Fujii et al., 2001). Un trabajo realizado por Delgado y colaboradores observó que el DD se incrementaba en las primeras 24 horas y permanecía elevado durante la primera semana tras la hemorragia intracraneal espontánea. Además, el nivel basal elevado de DD predecía el deterioro neurológico precoz y la mortalidad. Aunque no está claro por qué se produce esta asociación, se ha descrito que el DD, por si mismo,

estimula la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) (Robson et al., 1994), la cual se ha asociado con el crecimiento del edema y del hematoma cerebral (Castillo et al., 2002; Silva et al., 2005).

1.2.2.4 S100B

S100B es una proteína ligante de calcio que pertenece a la extensa familia de las proteínas S100, un grupo de moléculas Ca^{2+} dependientes que están formadas por la unión de dos dímeros denominados α y β , y se encuentran sólo en animales vertebrados (Donato et al., 2003). El nombre procede del hecho de que todas son solubles en una disolución saturada al 100% con sulfato de amonio (Moore et al., 1965). La proteína S100B se compone de dos subunidades β y se encuentra distribuída principalmente en el compartimento astrogliar, además de otras células cerebrales, en las células de Schwann del sistema nervioso periférico y en diferentes poblaciones celulares no neurales, como los melanocitos, adipocitos y condrocitos (Donato et al., 2001). Dentro del sistema nervioso central, se creyó en un principio que S100B se expresaba exclusivamente en los astrocitos, pero recientemente se ha descrito también en oligodendrocitos, epitelio de los plexos coroides y neuronas (Steiner et al., 2007). Incluso se ha planteado que S100B pueda ser un marcador de disfunción de la barrera hematoencefálica más que un marcador específico de daño glial (Kapural et al., 2002).

La proteína S100B cumple funciones reguladoras tanto a nivel intracelular como extracelular. A nivel intracelular actúa estimulando la proliferación y migración celular y también se ha mostrado capaz de inhibir la apoptosis y la diferenciación celular. Así mismo, se considera relevante en la activación de los astrocitos en el curso del daño cerebral y de diferentes procesos neurodegenerativos (Donato et al., 2009). A nivel extracelular, S100B se une al receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE) en la superficie de diferentes células. Dependiendo de la concentración que alcance a nivel extracelular, del tipo celular y del microambiente que rodea a la célula, los efectos finales de S100B pueden tener sentidos opuestos, por ejemplo

puede tener un papel proliferativo o tóxico (Donato et al., 2009). En las neuronas, el efecto trófico, producido a concentraciones bajas (nanomolar), consistiría en favorecer el crecimiento de las neuritas y aumentar la supervivencia neuronal tras una lesión. Sin embargo, a concentraciones mayores (micromolar), es capaz de inducir la apoptosis neuronal, activando la cascada de las caspasas y aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Donato et al., 2001). Actualmente se considera que los astrocitos responden ante la lesión liberando S100B al medio extracelular y en esta línea, se ha encontrado que la concentración de S100B aumenta en sangre periférica tras un ictus isquémico (Buttner et al., 1997), un traumatismo craneoencefálico (Rothoerl et al., 2000) o un paro cardíaco (Rosen et al., 1998).

Múltiples situaciones clínicas se han asociado a un incremento de los niveles de S100B en diversos líquidos biológicos. Así, se ha descrito un incremento de esta proteína en el LCR de niños con meningitis (Gazzolo et al., 2004) o en el suero de mujeres embarazadas con complicaciones hipertensivas (Schmidt et al., 2004). Se ha demostrado que varias enfermedades neoplásicas pueden conllevar incremento en los niveles sanguíneos de esta proteína, como los melanomas, schwannomas y neuroblastomas (Donato et al., 2001; Ishiguro et al., 1983). Por otra parte, se ha implicado en la patogenia de diversas enfermedades degenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, en la que se ha encontrado un aumento en la expresión génica de S100B y se piensa que induce la hiperfosforilación de la proteína TAU (Esposito et al., 2008), cuyo depósito contribuirá a la formación de los ovillos neurofibrilares, fundamentales en la génesis de esta enfermedad. Curiosamente, el gen de S100B se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 y se ha descrito que, en las personas con síndrome de Down, la concentración de esta proteína en sangre periférica alcanza entre 4 y 8 veces el límite alto de la normalidad (0,15 µg/L) (Varga et al., 2008). También permite predecir la aparición de hemorragia intraventricular en neonatos cuando la concentración en sangre materna supera los 0,72 microg/L, antes incluso que cualquier otro parámetro clínico, bioquímico o ultrasonográfico se altere (Gazzolo et al., 2006) y su elevación en orina se correlaciona con el grado de hemorragia intraventricular cuando se mide en neonatos pretérmino (Gazzolo et al., 2001). De hecho este

grupo de trabajo considera que S100B puede ser un biomarcador muy útil en la medicina perinatal (Michetti et al., 2002). Por otro lado, incluso se ha postulado la utilidad de su determinación precoz en el LCR postmortem para ayudar en el esclarecimiento de la causa de la muerte (Li et al., 2009).

En cuanto al ictus isquémico agudo, numerosas publicaciones reflejan la relación de S100B con diferentes aspectos de la enfermedad, incluyendo el diagnóstico, la predicción de complicaciones y el pronóstico del ictus. Missler y colaboradores encontraron que la concentración plasmática de S100B se incrementaba a las 8-10 horas tras el inicio del ictus y era máxima entre el segundo y tercer día. Esta concentración se relacionaba con el volumen del infarto y con el estado funcional final del paciente (Missler et al., 1997). Además, se ha descrito que el incremento de S100B es mayor en los pacientes con ictus corticales, originados por enfermedad de gran vaso, comparado con aquellos pacientes con ictus lacunares (Wunderlich et al., 2004), aunque no queda claro si estos resultados se deben únicamente a la diferencia en el volumen del infarto. En esta línea, un estudio mostró que, los niveles de S100B en los pacientes con AIT o sin signos de isquemia en la TC inicial, eran significativamente más bajos que en los pacientes con déficit establecido y alteraciones radiológicas en la evaluación inicial (Eltting et al., 2000). Se han realizado varios intentos de mejorar la sensibilidad de S100B para el diagnóstico del ictus, incluyéndolo en un panel de varios biomarcadores. Sin embargo, los resultados no han sido muy alentadores porque, o bien se utilizaron controles sin clínica neurológica (Reynolds et al., 2003; Lynch et al., 2004) o bien, cuando se compararon pacientes con ictus y mimics, la sensibilidad (81%) y especificidad (70%) no eran lo suficientemente altas como para recomendar su uso clínico (Laskowitz et al., 2005; Laskowitz et al., 2009).

Por otra parte, Foerch y colaboradores encontraron que los niveles en suero de esta proteína se correlacionaban con la gravedad de la lesión y la situación funcional en un grupo de 51 pacientes, 16 de los cuales desarrollaron un infarto maligno de la ACM (Foerch et al., 2004). En concreto, estos autores observaron que la concentración de S100B $>1,03 \mu\text{g/L}$, a partir de las 12 horas del inicio, predecía la evolución maligna del infarto con una sensibilidad del

94% y especificidad del 83%. En otro trabajo, estos autores ya habían mostrado que los niveles de S100B en sangre periférica son menores en los pacientes que experimentan una recanalización precoz, en menos de 6 horas, que en aquellos en los que el vaso permanece ocluído más tiempo (Foerch et al., 2003). De forma interesante, se ha descrito que los niveles de S100B $>0,23\mu\text{g/L}$, medidos antes del tratamiento trombolítico, predicen la transformación hemorràgica, aunque la sensibilidad para predecir la aparición de un hematoma parenquimatoso grado PH2 resultó baja (46%) (Foerch et al., 2007).

En cuanto a su valor pronóstico, varios estudios muestran que los niveles de S100B se correlacionan con el volumen final del infarto y el grado de déficit neurológico (Abraha et al., 1997; Missler et al., 1997; Wunderlich et al., 2004; Foerch et al., 2005). En esta línea, Jauch y colaboradores encontraron un peor resultado funcional a los 3 meses, en los pacientes que mostraron cambios más rápidos en la concentración de S100B tras las primeras 24 horas del ictus (Jauch et al., 2006). Tanto los niveles de S100B medidos en las primeras horas (12 horas) (Sienkiewicz-Jarosz et al., 2009) como de forma tardía (48 horas) (Foerch et al., 2005) son predictores del pronóstico funcional del paciente al tercer mes. Sin embargo, ningún estudio ha demostrado que esta predicción sea independiente del volumen final del infarto (Dassan et al., 2009).

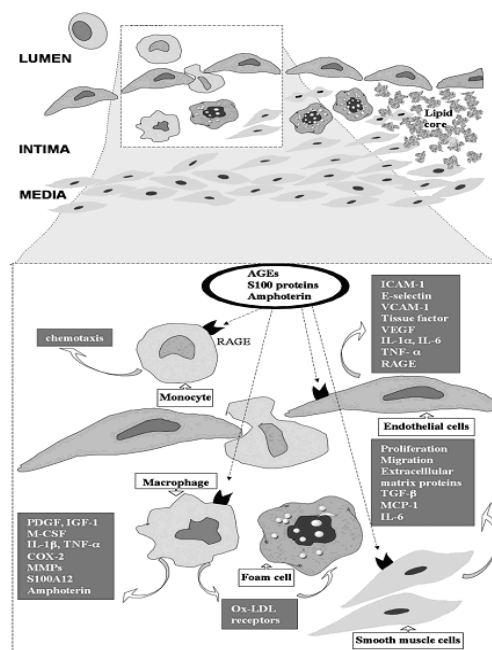
En el ámbito del ictus hemorràgico, S100B se encontró elevado en un grupo de 78 pacientes con hemorragia intracerebral a su llegada a urgencias. Además de encontrar relación directa entre el nivel de S100B y el volumen de la hemorragia cerebral, también se observó que los pacientes que presentaban un deterioro precoz mostraban niveles más elevados de S100B (256,8 vs. 89,7 pg/mL; $p<0,0001$) al igual que los pacientes con peor situación funcional al tercer mes tras el ictus (136 vs. 75,91 pg/mL, $p=0,001$) (Delgado et al., 2006). Recientemente se ha relacionado el nivel basal de S100B con la mortalidad a los 7 días tras el inicio de los síntomas del ictus hemorràgico (OR 1,046 IC95% 1,014-1,078; $p=0,004$) (Hu et al., 2010).

1.2.2.5 sRAGE

El receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE) es un receptor transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Neeper et al., 1992). Fue identificado en 1992, aislándose del endotelio pulmonar bovino, como un receptor de proteínas y lípidos modificados por la glicosilación no enzimática, principalmente en el contexto de la diabetes (Schmidt et al., 1992). Este receptor es capaz de reconocer a una amplia variedad de ligandos, entre los que se encuentran los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs), diversas proteínas de la familia S100, la anfoterina (también conocida como HMG1) y el amiloide β (Schmidt et al., 2001; Yan et al., 1996). RAGE es una proteína de 45-kDa, cuya forma madura en humanos consta de 403 aminoácidos, (Schmidt et al., 1992) y se expresa en una amplia variedad de tejidos (Brett et al., 1993). Este receptor está formado por dos dominios extracelulares (uno constante y otro variable), un dominio transmembrana y otro intracitoplasmático, que resulta esencial para la transducción de la señal (Neeper et al., 1992). Además, se han descrito varias formas truncadas de RAGE que se forman por un mecanismo de *splicing* alternativo. Una de estas formas, conocida como RAGE soluble (sRAGE), pierde los dominios transmembrana e intracitoplasmático, se secreta extracelularmente y puede detectarse en la sangre circulante (Yonekura et al., 2003). También una forma de sRAGE puede proceder de la fragmentación enzimática de la región extracelular del receptor (Basta et al., 2009). Además, se han descrito tres nuevos transcritos que codifican para formas solubles de RAGE en humanos (Schlueter et al., 2003).

En cuanto a su función, la unión de RAGE con sus ligandos produce la activación celular, induciendo finalmente un amplio espectro de mecanismos de señalización y de estrés oxidativo. Esta señalización dará lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión y así, se piensa que RAGE juega un papel central en el inicio y cronificación de la inflamación, y por tanto, se considera una proteína que promueve los procesos de aterosclerosis (Basta et al., 2008), puesto que los procesos inflamatorios desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y complicación de la placa

de ateroma. De hecho, RAGE se sobreexpresa en la superficie de todas las células que participan en el desarrollo de la placa de ateroma, como son las células endoteliales, células de músculo liso, monocitos y linfocitos (Ritthaler et al., 1995; Brett et al., 1993). La unión de RAGE con los AGEs en la célula endotelial, induce la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1, ICAM-1 y e-selectina (Basta et al., 2002) y favorece un estado protrombótico en la superficie endotelial, con la disminución de trombomodulina y la expresión del factor tisular (Esposito et al., 1989; Bierhaus et al., 1997). Por otro lado, tanto la unión de RAGE con los AGEs como con la proteína S100A12, promueven la migración de monocitos, su transformación en macrófagos activados (Kirstein et al., 1990; Hofmann et al., 1999) y la expresión de receptores para las moléculas LDL oxidadas en la superficie de dichos macrófagos (Iwashima et al., 2000), favoreciendo la formación de células espumosas. Además, a nivel de las células musculares lisas, se producirá un efecto de migración hacia el endotelio y proliferación celular cuando RAGE es activado (Higashi et al., 1997; Porto et al., 2006; Reddy et al., 2006). También RAGE favorece la expresión de TGF-beta, un regulador importante de la producción de la matriz extracelular, por parte de las células musculares lisas (Wolf et al., 1994).



La figura muestra el papel que RAGE desempeña en los procesos inflamatorios que contribuyen a la formación de la placa de ateroma. Tomado de Basta, 2008.

Un hecho peculiar es que la interacción de RAGE con sus ligandos produce, por un mecanismo de *feedback* positivo, un incremento en la expresión del receptor (Hori et al., 1995), y probablemente este hecho favorece la amplificación de la respuesta inflamatoria en la pared vascular y su perpetuación en forma de inflamación crónica. Por otro lado, dependiendo de la intensidad y duración de la estimulación producida por sus ligandos se activarán unas u otras vías de señalización (Kislinger et al., 1999; Lander et al., 1997). Además de sus ligandos, otras citoquinas y moléculas proinflamatorias, como el TNF-alfa (Takeda et al., 2005) y la proteína C reactiva (Zhong et al., 2006) promueven su expresión. Por el contrario, se ha observado que la estimulación del receptor PPAR γ disminuye la expresión de RAGE (Wang et al., 2006).

En cuanto al sRAGE, forma truncada de la proteína que puede detectarse en la sangre periférica, puede estar constituida en realidad por varios tipos de moléculas. Principalmente, una isoforma endógena, secretada al espacio extracelular (esRAGE), que se piensa que actúa uniéndose a los diferentes ligandos y así limitando la activación de RAGE en la superficie celular (Yonekura et al., 2003). A favor de esta acción encontramos que la administración exógena de sRAGE tiene efectos beneficiosos en el desarrollo de la enfermedad ateromatosa en diferentes modelos experimentales animales (Wautier et al., 1994; Park et al., 1998; Zhou et al., 2003). Sin embargo la fracción de sRAGE que podemos detectar en sangre también podría estar constituida por la fragmentación del RAGE en la superficie celular mediada por la acción de las metaloproteinasas extracelulares (Hudson et al., 2005).

Varios estudios han intentado relacionar los niveles de sRAGE con diferentes entidades clínicas, especialmente la enfermedad vascular y el síndrome metabólico. Falcone y colaboradores encontraron que niveles bajos de sRAGE en varones se asociaba a un mayor riesgo de enfermedad coronaria demostrada angiográficamente (Falcone et al., 2005). Los componentes del síndrome metabólico, como el índice de masa corporal, la hemoglobina glicada HbA1c y el índice de resistencia a la insulina se correlacionan de forma inversa

con los niveles de sRAGE (Koyama et al., 2005). Paralelamente, otros estudios mostraron que en pacientes con diabetes tipo 1 los niveles de esRAGE circulantes estaban disminuidos. Estos niveles bajos de esRAGE se relacionaban inversamente con las complicaciones vasculares diabéticas (Katakami et al., 2005) y resultaban predictores de mortalidad cardiovascular tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos con enfermedad renal avanzada (Koyama et al., 2007). De forma controvertida otros estudios han observado niveles elevados de sRAGE en pacientes con diabetes de tipo 2 (Tan et al., 2006; Nakamura et al., 2007). Cabe señalar que se han utilizado diferentes tipos de anticuerpos en estos estudios, unos diseñados contra el RAGE de membrana que no podrían distinguir entre las diferentes fracciones que constituyen el RAGE plasmático y otros más específicos, como por ejemplo los dirigidos contra esRAGE, que si lo harían. Así, es posible que los resultados aparentemente contradictorios se deban a la diferente metodología empleada en los distintos estudios.

En cuanto a la isquemia cerebral, Pichiule y colaboradores observaron a nivel experimental, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la hipoxia estimula la expresión de RAGE a nivel de las neuronas y lo hace a través del factor de transcripción inducible por hipoxia de tipo 1 alfa (HIF-1 α) (Pichiule et al., 2007). En un estudio realizado en tejido cerebral humano procedente de 12 pacientes también se ha encontrado una expresión aumentada de RAGE en la zona de infarto isquémico comparada con el hemisferio contralateral (Zhai et al., 2008). Estos mismo autores encuentran en un modelo de isquemia cerebral permanente en rata, que RAGE se sobreexpresa fundamentalmente en la zona de penumbra isquémica durante los dos primeros días tras el inicio de la isquemia. De forma controvertida, algunos autores observan que el efecto de RAGE parece ser neuroprotector puesto que los ratones deficientes genéticamente para RAGE mostraron un volumen de infarto mayor a las 24 horas del inicio de la isquemia (Pichiule et al., 2007), mientras que otros autores encuentran que la activación de RAGE por la anfoterina media el daño neuronal isquémico, puesto que su inhibición por efecto del sRAGE, o su ausencia, en el caso de los modelos murino deficientes para RAGE, conlleva un menor volumen del infarto (Muhammad et al., 2007). De acuerdo con este

último grupo, Hassid y colaboradores, observan mayor volumen lesional en un grupo de ratones transgénicos que sobreexpresan RAGE en las neuronas frente a otro grupo de ratones transgénicos que presentan una forma no funcional de RAGE, al truncarse el dominio intracelular de la proteína (Hassid et al., 2009).

En pacientes con ictus isquémico agudo de etiología no cardioembólica se ha encontrado que los niveles de sRAGE estarían disminuidos frente a controles sanos y que los niveles de sRAGE se asociarían de forma inversa con el grado de afectación neurológica, aunque sólo en el grupo de pacientes sin hipertensión, diabetes ni dislipemia (Park et al., 2009). En una cohorte de 180 sujetos no diabéticos seguidos durante 48 meses, Chiang y colaboradores encontraron que los niveles bajos de sRAGE se asociaban a la aparición de eventos vasculares, incluidos los ictus (Chiang et al., 2009). Así mismo, se encontró una asociación entre los niveles bajos de sRAGE y la leucoaraiosis extensa en un grupo de 482 pacientes con ictus, tanto isquémicos como hemorrágicos (Yokota et al., 2009).

1.2.3 BIOMARCADORES Y TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

En el momento actual, el tratamiento farmacológico de elección en la fase aguda del ictus isquémico es la administración de rt-PA en las primeras 4,5 horas tras el inicio de los síntomas. Sin embargo, aproximadamente sólo el 14,25% de los pacientes recibe el tratamiento fibrinolítico (Lichtman et al., 2009). La posibilidad de aparición de efectos secundarios graves, fundamentalmente la hemorragia intracerebral, es el principal factor limitante de su administración (Katzan et al., 2001). Así mismo, la eficacia del fármaco no siempre es la deseada y algunos pacientes no experimentan la recanalización del vaso ocluido, a pesar de un correcto tratamiento. Esto sirve para ilustrar una realidad que habitualmente encontramos en la práctica clínica, como es la variabilidad en la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes que de inicio parecen semejantes. Sin duda, el estudio de biomarcadores que ayuden a predecir la respuesta a los fármacos que utilizamos y así, puedan contribuir a guiar el tratamiento tendría una extraordinaria importancia y repercusión en nuestra práctica clínica.

1.2.3.1 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO FIBRINOLÍTICO

La eficacia del tratamiento con rt-PA intravenoso vendrá determinada por la apertura o recanalización de la arteria que permanecía ocluída y el tiempo en que esta se produce, lo cual guarda relación, en última instancia, con el estado funcional y neurológico del paciente a corto y largo plazo. Sin embargo, las tasas de recanalización arterial no se determinaron en los amplios ensayos clínicos realizados con rt-PA, como el NINDS (NINDS, 1995) o el ECASS (Hacke et al., 1995; Hacke et al., 1998) y el conocimiento actual de la aparición de la recanalización procede del estudio de series de pacientes, que sitúa la tasa de recanalización completa del vaso en un 30-36% de los pacientes tratados (Alexandrov et al., 2000; Molina et al. 2004). Además, si diferenciamos la recanalización completa de la parcial, el 70% de los pacientes experimentará algún grado de recanalización parcial y en general podemos afirmar que en el 33,8-40% de los pacientes la arteria permanecerá ocluída (Chritou et al., 2000; Alexandrov et al. 2000; Demchuck et al., 2001; Molina et al. 2004).

La carga genética individual puede predisponer a que la recanalización se realice con mayor o menor éxito y así, se ha demostrado que la combinación de dos SNPs en los genes del TAFI y del PAI-1 influyen en la tasa de recanalización de los pacientes que reciben rt-PA, de manera que los portadores homocigotos del genotipo TAFI Ile/Ile que también son portadores del alelo 4G en el gen del PAI-1, muestran las tasas más bajas de recanalización (7,1% vs. 45,9%) a la hora de iniciado el tratamiento (Fernández-Cadenas et al., 2007). También el genotipo de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) se ha relacionado con la apertura del vaso, mostrando los pacientes con el genotipo DD para el polimorfismo In/Del en el gen de esta enzima unas tasas más altas de recanalización que el resto (Fernández-Cadenas et al., 2006).

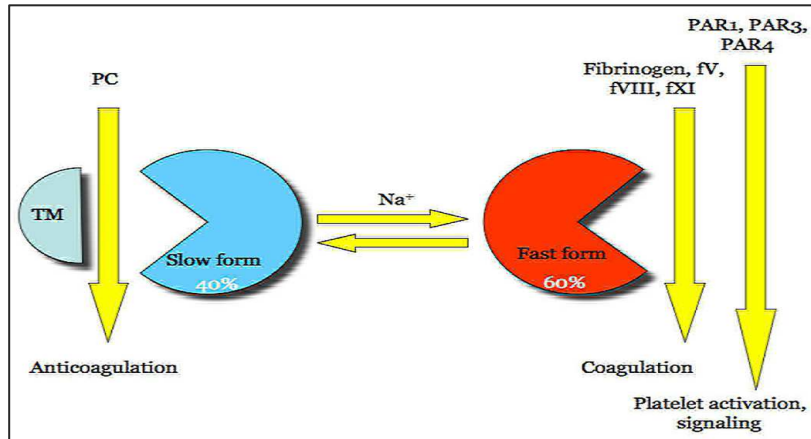
Por otra parte, numerosas moléculas se han asociado con las tasas de recanalización en pacientes que reciben rt-PA. En este sentido, los pacientes

que recanalizan tienen niveles basales de PAI-1 más bajos en plasma y muestran una tendencia a presentar niveles más bajos de lipoproteína A que los que no recanalizan tras el tratamiento fibrinolítico (Ribó et al., 2004-a). Del mismo modo, los niveles bajos de alfa-2-antiplasmina son predictores independientes de la recanalización tras el tratamiento con rt-PA (Martí-Fàbregas J et al., 2005). Además otros factores como la hiperglucemia en la fase aguda, la gravedad de la afectación neurológica (Ribó et al., 2005) o la dislipemia (Fernández-Cadenas et al., 2007) se asocian a una menor tasa de recanalización. En cualquier caso, es evidente que el estudio de estos biomarcadores es incipiente y el descubrimiento de nuevos marcadores sería de gran utilidad para guiar el tratamiento de los pacientes con ictus durante la fase aguda. Por ejemplo, la detección de biomarcadores predictores de una pobre respuesta al tratamiento trombolítico, bien por falta o retraso en la recanalización de la arteria, o por reoclusión de la misma, podría permitir ajustar la dosis administrada del fármaco, incrementando posiblemente el beneficio terapéutico.

1.2.3.2 TROMBINA

La trombina es una serín proteasa plasmática que se considera la enzima central del sistema de la hemostasia y desempeña funciones opuestas en los procesos de coagulación de la sangre. Está formada por dos cadenas de 36 y 259 aminoácidos cada una que se unen por un puente disulfuro y tiene un peso molecular de 33701 daltons (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Se expresa en hepatocitos, al igual que otros factores de la coagulación, pero también se ha encontrado en el tejido cerebral de ratas (Dihanich et al., 1991). La trombina, también llamada, factor II de la coagulación, se sintetiza a partir de su precursor, la protrombina, en una reacción catalizada por la tromboplastina en presencia de Ca^{2+} (Mann et al., 2003). En esta reacción se forman las cadenas ligera y pesada de la trombina y los fragmentos peptídicos de activación 1 y 2. La trombina ejerce múltiples efectos, en ocasiones de signo opuesto, y está sometida a un estricto y complejo sistema de regulación, existiendo dos vías de regulación alostérica de la trombina. En la primera de estas vías, la unión del Na^+ a la trombina incrementa su actividad procoagulante y protrombótica,

mientras que, en la segunda vía de regulación, la unión de la trombina a la trombomodulina favorece la síntesis de proteína C activada (APC) y por tanto, tiene un efecto anticoagulante (Di Cera et al., 2007).

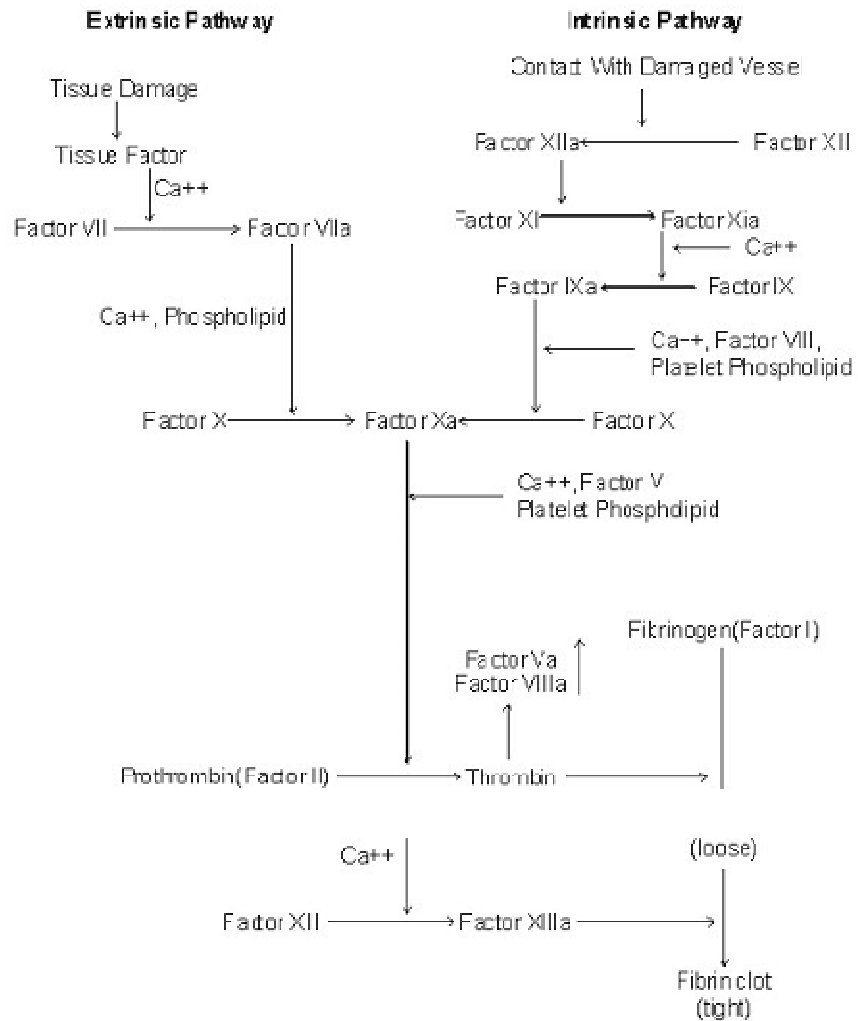


La figura muestra las acciones contrapuestas de la trombina en función de su unión al Na⁺ o a la trombomodulina. Tomado de Di Cera et al., 2008.

La cascada de la coagulación se inicia cuando, debido a un daño en la pared del vaso sanguíneo, queda expuesto en el torrente circulatorio el factor tisular, que rápidamente forma un complejo con el factor VIIa, y conduce a la síntesis de pequeñas cantidades de factor Xa (vía extrínseca). Por otro lado, el colágeno y la kalicreína, tras el daño tisular, desencadenan una serie de reacciones que secuencialmente darán lugar a los factores XIIa, XIa, IXa y Xa (vía intrínseca). Ambas vías convergen en el factor Xa, el cual activará a los factores Va y VIIIa, que retroalimentan a su vez la síntesis de más cantidad de factor Xa. Cuando la concentración del factor Xa alcanza un punto crítico se forma el complejo protrombinasa, constituido por los factores Xa, Va, Ca²⁺ y fosfolípidos de membrana con carga negativa, y dicho complejo desencadena la síntesis masiva de trombina a partir de la protrombina (Mann et al., 2003). Una vez sintetizada en el torrente sanguíneo, la trombina desempeña dos funciones principales y paradójicamente opuestas (Griffin et al., 1995). Por un lado, actúa como un factor procoagulante, al transformar el fibrinógeno en monómeros de fibrina que estabilizarán el coágulo sanguíneo. Esta acción se complementa con la activación del factor XIII, que aumenta la estabilidad del coágulo de fibrina mediante el establecimiento de enlaces covalentes entre los

monómeros de fibrina (Lorand et al., 1968). Además, la trombina es capaz de inhibir la fibrinólisis, mediante la activación del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (Bajzar et al., 1996) y perpetúa la cascada de la coagulación por medio de la activación de los factores V, VIII y XI (Mann et al., 2003). Por otra parte, la unión de la trombina con la trombomodulina en la membrana de la célula endotelial, impide que ejerza su acción sobre el fibrinógeno y además incrementa más de 1000 veces la afinidad de la trombomodulina por la proteína C de la coagulación. La formación del complejo trombomodulina, proteína C y receptor de la proteína C (EPCR) conduce a la síntesis de APC, la cual tiene un efecto anticoagulante mediante la inactivación proteolítica de los factores VIIIa y Va, que son imprescindibles en la síntesis de trombina (Esmon et al., 2003). Este sistema constituye un mecanismo de regulación negativo, especialmente importante en la microcirculación, que impide la síntesis masiva de fibrina en el torrente circulatorio. Además de este mecanismo de regulación a la baja, la trombina se inactiva de forma irreversible mediante la unión a su sitio activo de la antitrombina III, reacción que acelera la heparina (Gettins et al., 2002). Otro mecanismo de inhibición lo constituye la unión de la trombina con el cofactor II de la heparina específico de trombina (Tollefsen et al., 2006). Al final, la eficiencia de la cascada de la coagulación depende de un equilibrio dinámico entre las tendencias procoagulantes y anticoagulantes, en el cual desempeña un papel fundamental la trombina (Di Cera et al., 2008).

Coagulation Cascade



La imagen muestra las reacciones que tienen lugar en la cascada de la coagulación. Tomado de http://www.arn.org/docs/glicksman/eyw_040501.htm.

Además de estas conocidas funciones, la trombina ejerce otras acciones, algunas directamente sobre las células, a través de la activación de varios receptores activados por proteasas (PARs). Estos receptores transmembrana, cuando son fragmentados por la trombina y otras proteasas en una región de su dominio extracelular, exponen un nuevo dominio que se une a diferentes ligandos y que, finalmente, activarán el receptor. Los receptores PAR1 y PAR4 son responsables de la activación de las plaquetas en humanos

a baja y alta concentración de trombina respectivamente, favoreciendo su agregación. De este modo, la trombina ejerce un efecto protrombótico, además de procoagulante (Coughlin et al., 2000). Por otro lado, la trombina también degrada otra relevante molécula, la osteopontina, que tiene importantes acciones en el mantenimiento de la inflamación crónica y en la enfermedad cardiovascular (Scatena et al., 2007). También se ha descrito que la trombina puede actuar como una molécula quimiotáctica para los monocitos (Bar-Shavit et al., 1983), además de presentar propiedades de adhesión (Bar-Shavit et al., 1991) y promover la migración de células a través de la matriz extracelular (Di Cera et al., 2007).

El papel central que desempeña la trombina en la hemostasia se confirma a nivel clínico por las consecuencias protrombóticas que tienen las mutaciones en el gen de la protrombina (F2). Así, la mutación 20210G-A en el gen F2, junto con el factor V Leiden, son los factores genéticos conocidos más frecuentes en las situaciones de trombofilia hereditaria. Esta mutación produce un incremento en los niveles de protrombina en sangre y un aumento del riesgo trombótico (Poort et al., 1996). En los pacientes portadores de la mutación 20210G-A de la protrombina se duplica el riesgo relativo de sufrir una trombosis venosa profunda respecto a los individuos sin la mutación, mientras que el riesgo relativo se multiplica por 6 si además son portadores del factor V Leiden (Martinelli et al., 2000). También se ha asociado esta mutación en la protrombina con la presencia de trombosis venosa cerebral (Martinelli et al., 1998). En cuanto al riesgo de ictus isquémico, en un meta-análisis de 19 estudios caso-control que incluyó un total de 3.028 individuos, Casas y colaboradores encontraron una asociación estadísticamente significativa de la mutación 20210G-A de la protrombina con el ictus isquémico (OR=1,4 IC95% 1,11-1,86) (Casas et al., 2004).

Como biomarcador, la trombina se ha relacionado con la presencia de fibrilación auricular, encontrándose tanto la concentración como la actividad de la trombina elevados en sangre periférica en ese contexto clínico (Becker et al., 2005).

En el ámbito de la enfermedad cerebrovascular, se han realizado múltiples intentos de relacionar la actividad y la concentración de la trombina en sangre periférica con el ictus isquémico. Ya en el año 1983 se describió un aumento de la actividad de la trombina en los pacientes con ictus isquémico respecto a los controles sanos (Lane et al., 1983), medido de forma indirecta por la determinación del fibrinopéptido A (FpA), que es liberado al plasma durante la síntesis de fibrina. Más tarde, se observó que los niveles de FpA permanecían elevados durante la primera semana tras el ictus y descendían lentamente en el mes siguiente indicando una activación del sistema de la coagulación en ese periodo (Feinberg et al., 1989). Fon y colaboradores encontraron en un grupo reducido de 35 pacientes con AIT que los niveles de FpA y del complejo trombina-antitrombina III (TAT) aparecían elevados en los 7 días siguientes a la isquemia transitoria y se normalizaban al cabo de 1 mes (Fon et al., 1994). Los niveles de FpA se postularon como un biomarcador del riesgo de ictus en pacientes jóvenes con el síndrome antifosfolípido tras investigar un grupo de 57 sujetos, 27 de los cuales habían sufrido un ictus (Ellis et al., 2000). De forma muy interesante, Côtè y colaboradores estudiaron a un grupo de 239 pacientes con enfermedad carotídea, asintomática o tras un AIT, que fueron seguidos durante 2,8 +/-1,3 años y observaron en el análisis de supervivencia que los niveles del fragmento 1.2 de la protrombina (F 1.2) predecían de forma independiente el tiempo de aparición de un ictus isquémico o infarto de miocardio (Côtè et al., 2000).

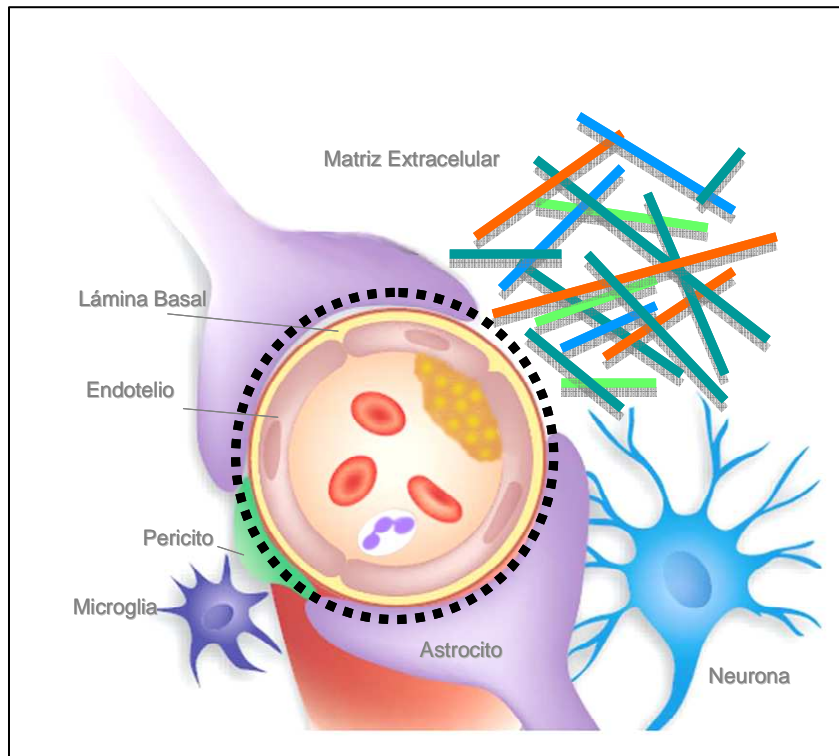
Más adelante se postuló un papel de la determinación secuencial de varios marcadores de la coagulación y la fibrinólisis para ayudar en la clasificación etiológica del ictus isquémico, mostrándose que los ictus de etiología cardioembólica presentaban los mayores niveles de TAT y FpA, así como de DD, en las primeras 48 horas tras el ictus cuando se comparaban con controles, ictus aterotrombóticos y lacunares (Kataoka et al., 2000). En cuanto a la progresión del ictus, Barber y colaboradores determinaron los niveles de TAT y del F 1.2, entre otros marcadores de hemostasia y fibrinólisis en pacientes con deterioro neurológico temprano y observaron en el análisis univariante niveles más altos de ambas moléculas en los pacientes que progresaban. Sin embargo, la asociación se perdía en el análisis multivariante y

sólo el DD y la presión arterial sistólica elevada permanecían como predictores independientes del empeoramiento neurológico (Barber et al., 2004). Por otro lado se han realizado intentos de relacionar diversos marcadores de la coagulación y fibrinólisis, entre ellos el F 1.2, con la eficacia y la seguridad del tratamiento fibrinolítico en los pacientes con ictus, sin que se hayan podido encontrar diferencias significativas (Martí-Fábregas et al., 2005; Cocho et al., 2006). Solamente en un estudio diseñado por Tanne y colaboradores se describió que los niveles elevados de TAT medidos 24 horas tras el inicio del tratamiento fibrinolítico predecían la mortalidad al tercer mes del ictus isquémico (Tanne et al., 2006).

1.2.3.3 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Sin duda, un punto de especial relevancia en la identificación de biomarcadores capaces de guiar el tratamiento fibrinolítico es mejorar la seguridad del mismo. La administración del rt-PA tiene en ocasiones consecuencias indeseables y, de hecho, las complicaciones hemorrágicas son el principal factor limitante en la administración de este fármaco. En este sentido, el hallazgo de predictores de transformación hemorrágica tras el tratamiento trombolítico permitiría que un grupo más amplio de pacientes se beneficiaran de este tratamiento de forma más segura.

En este aspecto, la disrupción de la barrera hematoencefálica desempeña un papel fundamental en la transformación hemorrágica del infarto. Uno de los efectos deletéreos al final de la cascada isquémica es precisamente el aumento de la permeabilidad endotelial. En este proceso juegan un papel fundamental las metaloproteinasas de matriz (MMPs), una familia de enzimas proteolíticas, Zn-dependientes, que fisiológicamente se encargan del remodelado de la matriz extracelular. Se sabe que los neutrófilos que se acumulan en la zona isquémica emplean la producción de MMPs para migrar a través del endotelio y mediante este mecanismo desestructuran la barrera hematoencefálica (BHE) (Gidday et al, 2005; Rosell et al, 2008).



La figura muestra la estructura básica de la barrera hematoencefálica dentro de la unidad neurovascular. Con el permiso de Dr. Eloy Cuadrado.

Estos procesos cobran especial relevancia en los pacientes que reciben tratamiento trombolítico con rt-PA. De hecho, se ha publicado que, tras la administración directa intraventricular de rt-PA en el cerebro de ratón, el t-PA se une a LRP ("LDL receptor-related-protein"), promoviendo el aumento de expresión de MMP-9 y, consecuentemente, incrementando la permeabilidad de la BHE (Wang et al., 2003). Paralelamente, otros estudios en modelos de isquemia cerebral en roedores han demostrado que la administración exógena de rt-PA incrementa los niveles de MMP-9 en el cerebro isquémico del ratón, medido por la técnica de zimografía. Además, en un experimento en el que ratones deficientes para el gen del t-PA eran sometidos a una isquemia cerebral transitoria de 2 horas, se observó que los niveles de MMP-9 en el parénquima cerebral y el edema eran menores que los encontrados en ratones no deficientes y que la administración exógena de rt-PA en dichos ratones deficientes reinstaura la respuesta de MMP-9 (Tsuji et al., 2005). Recientemente, nuestro grupo ha descrito la liberación *ex vivo* de MMP9, MMP8 y de uno de los inhibidores tisulares de las MMPs, TIMP-2, por los neutrófilos cuando son tratados con rt-PA (Cuadrado et al., 2008). Así mismo,

encontramos en muestras de tejido cerebral de pacientes que habían sufrido transformación hemorrágica, un intenso infiltrado de neutrófilos positivos en la inmunotinción para MMP-9 en áreas vasculares con degradación de colágeno tipo IV de la membrana basal y extravasación de hematíes (Rosell et al., 2008). Estos hallazgos sugieren que el neutrófilo podría ser la principal fuente celular de MMP-9 en las áreas de transformación hemorrágica. De forma complementaria, se ha descrito la implicación de otra metaloproteinasa, la MMP-3, en la transformación hemorrágica tras rt-PA utilizando varios modelos murinos deficientes para MMP-3, MMP-9 y plasminógeno (Suzuki et al, 2007). Estos autores demostraron que, tras realizar una isquemia cerebral permanente y tratar a los ratones con rt-PA, la transformación hemorrágica era menor en los ratones deficientes para el plasminógeno y la MMP-3 comparados con los ratones no deficientes. No encontraron cambios significativos en los niveles de la MMP-9 y concluyeron que ambas moléculas podrían contribuir en mayor medida a la disrupción de la BHE que la MMP-9.

En cuanto al ser humano, sabemos que en pacientes tratados con rt-PA, se produce un pico de MMP-9 en sangre periférica entre 1 y 3 horas después del tratamiento y que éste es más acusado en los casos que posteriormente presentan complicaciones hemorrágicas (Montaner et al., 2001). También se ha publicado que los niveles basales de MMP-9 predicen de forma independiente las complicaciones hemorrágicas (Montaner et al., 2003). En otro estudio se ha detectado una sobreexpresión de MMP-9 en las zonas del parénquima con áreas de transformación hemorrágica respecto a otras zonas infartadas o al hemisferio contralateral, en tejido cerebral humano (Rosell et al., 2005). Por lo tanto, parece que algunas MMPs pueden ser prometedores biomarcadores para la mejor selección de los pacientes candidatos a recibir la terapia trombolítica, mejorando así la seguridad y eficacia del tratamiento. De hecho, la co-administración de inhibidores de las MMPs como el Batimastat (BB-94) con rt-PA reduce la tasa de complicaciones hemorrágicas en un modelo embólico de isquemia cerebral en conejo, encontrando estos autores una tasa de hemorragia del 41% en los conejos tratados con rt-PA y el inhibidor frente al 77% de los conejos tratados sólo con rt-PA ($p < 0,05$) (Lapchak et al., 2000). En esta línea de investigación, recientemente se ha descrito un nuevo

inhibidor específico para las gelatinasas (SB-3CT) que, administrado en un modelo de isquemia cerebral focal murino, bloquea la MMP-9 y su actividad, reduce la degradación de laminina y rescata a las neuronas de la apoptosis (Gu et al., 2005).

Otras moléculas podrían servir como marcadores de la ruptura de la BHE y de la transformación hemorrágica del infarto cerebral, como es el caso de la fibronectina (Fn). Esta proteína es una molécula de adhesión que favorece interacciones entre las células y entre estas y la matriz extracelular. Se sintetiza principalmente en las células endoteliales y por eso se considera que la presencia de niveles elevados en plasma puede ser un marcador de daño endotelial. Castellanos y colaboradores mostraron que la fibronectina celular (c-Fn) plasmática pretratamiento estaba elevada en pacientes que más tarde presentaron complicaciones hemorrágicas inducidas por rt-PA (Castellanos et al., 2004).

Por otro lado, después de un evento isquémico, se produce una liberación de inhibidores endógenos de la fibrinólisis al torrente sanguíneo de cuyo balance final depende la capacidad fibrinolítica global y que pueden contribuir al desarrollo de TH sintomáticas. En este sentido, Ribó y colaboradores encontraron que los niveles de PAI-1 $<21,4$ ng/mL predecían la aparición de TH sintomática (valor predictivo positivo 75%, valor predictivo negativo 97,6%) (Ribó et al., 2004-b). También se ha descrito que la actividad de TAFI se incrementa tras la administración de fibrinolítico en pacientes con ictus isquémico (Willemse et al., 2008) y los niveles de TAFI $>180\%$ se asocian a TH sintomática (Ribó et al., 2004-b). González-Conejero y colaboradores estudiaron el efecto de un polimorfismo común y funcional en el gen del factor XIII de la coagulación (V34L), que produce cambios estructurales en el coágulo de fibrina, en 200 pacientes que recibieron rt-PA y encontraron que los portadores de este polimorfismo presentaban mayores tasas de TH sintomática (8,8% vs. 2,5%; $p=0,049$) y de mortalidad (20% vs. 9,1%; $p=0,034$) comparado con los pacientes no portadores del polimorfismo (González-Conejero et al., 2006).

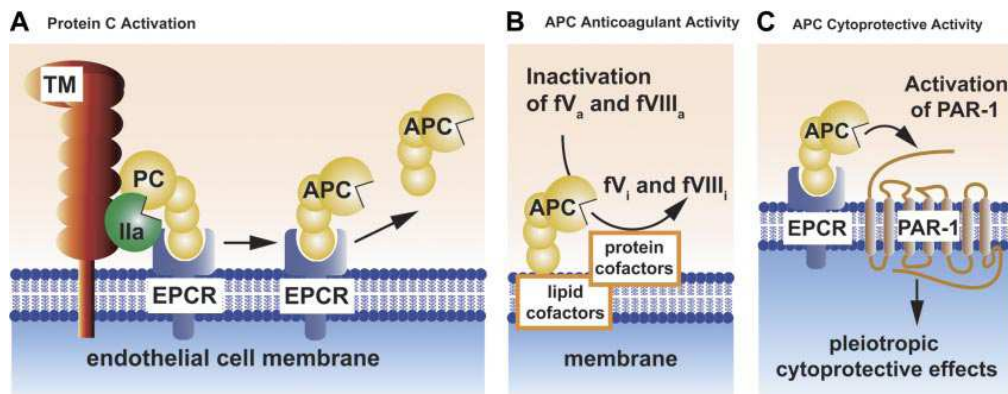
El estrés oxidativo inducido por la respuesta isquémica también se relaciona con la aparición de TH sintomática. Y así, se ha demostrado que el estrés oxidativo participa en la rotura de la BHE ligado a la activación de MMPs (Gasche et al., 2001). Además, las ROS que se sintetizan durante el proceso de reperfusión pueden desencadenar la apoptosis neuronal, debido a una insuficiente expresión de Cu/Zn superóxido-dismutasa y Mn superóxido-dismutasa, según se demuestra en un modelo de isquemia focal transitoria murino (Matsuda et al., 2009). En otro estudio, los F2-isoprostanos, radicales libres producto de la peroxidación del ácido araquidónico neuronal, se encuentran elevados en las 6 primeras horas tras el ictus y su nivel se correlaciona con el de MMP-9 (Kelly et al., 2008). Recientemente se ha encontrado que los niveles basales de malondialdehído (MDA), el principal producto de la peroxidación lipídica, se encuentran más elevados en los pacientes que reciben rt-PA y que más tarde presentarán una TH en grado de PH ($1,27 \pm 0,34$ vs. $1,10 \pm 0,32$ $\mu\text{mol/L}$, $p=0,028$) (Dominguez et al., 2010).

1.2.3.4 PROTEINA C ACTIVADA (APC)

La proteína C activada (APC) es una serín-proteasa plasmática que presenta actividad anticoagulante y un amplio espectro de funciones citoprotectoras (Joyce et al., 2001; Cheng et al., 2003; Mosnier et al., 2007). Su zimógeno, la proteína C de la coagulación, se activa de forma fisiológica en la superficie de las plaquetas y de las células endoteliales por la acción proteolítica del complejo trombina-trombomodulina, transformándose en APC (Esmon et al., 2003). Este proceso se potencia si la proteína C está unida a su receptor de la membrana endotelial (EPCR) (Stearns-Kurosawa et al., 1996). Una vez liberada, la APC ejerce su acción anticoagulante inactivando de forma irreversible a los factores de la coagulación Va y VIIIa, y bloqueando así la formación de nuevas moléculas de trombina. En este proceso participan varios cofactores, entre ellos la proteína S, el factor V, la lipoproteína de alta densidad (HDL), algunos fosfolípidos de membrana y glucoesfingolípidos (Mosnier et al., 2007).

El papel primordial de la APC como anticoagulante se confirma con las observaciones clínicas que muestran cómo pacientes con un déficit hereditario en la proteína C presentan estados protrombóticos y trombosis venosas recurrentes (Koster et al., 1995). Además, el factor hereditario más frecuentemente asociado con la trombosis venosa, el factor V Leiden, consiste en una mutación en la región en que el factor V es proteolizado por la APC (Mosnier et al., 2007). Por otro lado la APC, al disminuir la síntesis de trombina, limita la subsiguiente activación del TAFI (Bajzar et al., 1996) y es capaz de inactivar al PAI-1 (Salata et al., 1985) favoreciendo así los procesos de fibrinolisis.

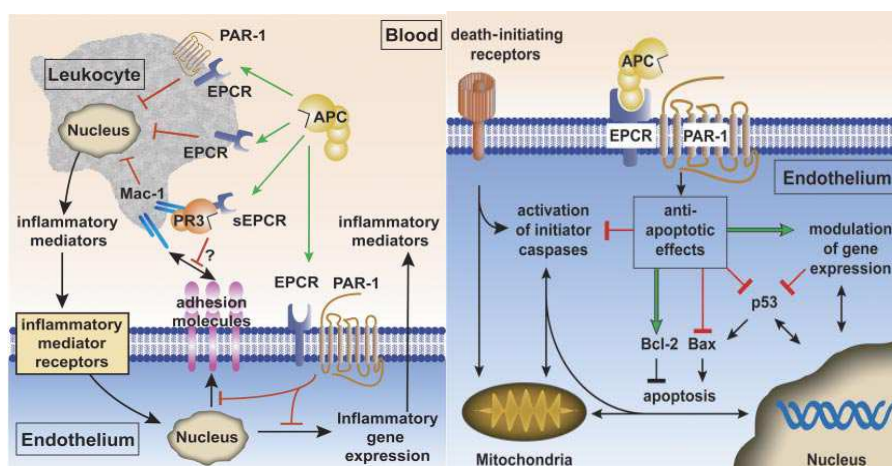
Respecto a la función citoprotectora, la APC ejerce múltiples efectos como las acciones anti-inflamatoria y antiapoptótica, la protección de la barrera endotelial y la modulación de la expresión de diversos genes. La mayor parte de estos efectos dependen de la unión de la APC con el receptor EPCR y de la consiguiente activación del receptor activado por proteasa de tipo 1 (PAR-1) (Yang et al., 2007). El efecto anti-inflamatorio de la APC no se reduce a la disminución de la síntesis de trombina y es independiente del efecto anticoagulante (Mosnier et al., 2007).



La figura ilustra el proceso de activación de la proteína C para dar lugar a la proteína C activada (APC) (A) y cómo la actividad anticoagulante (B) y citoprotectora (C) de la APC se ejercen por vías diferentes. Tomado de Mosnier et al., 2007.

La APC regula diversos genes que juegan un papel fundamental en la respuesta anti-inflamatoria y anti-apoptótica (Franscini et al., 2004; Joyce et al., 2003; Cheng et al., 2003; Riewald et al., 2002; Riewald et al., 2005) y reduce

directamente la expresión y función del factor de transcripción nuclear kappa-beta ($\text{NF}\kappa\beta$), inhibiendo así la señalización de varias citocinas (Mosnier et al., 2007). Así, la liberación de citocinas y de moléculas de adhesión desde las células endoteliales es inhibida por la APC, disminuyendo por tanto la infiltración de leucocitos en los tejidos (Nick et al., 2004). Por otra parte, en un modelo de hipoxia en células endoteliales cerebrales, la APC incrementó los niveles de moléculas antiapoptóticas, como las relacionadas con la familia Bcl-2 e inhibió la expresión de algunas proapoptóticas, como p53 y Bax (Cheng et al., 2003). De este modo, la APC es capaz de reducir varios de los signos característicos de la apoptosis, como la degradación del DNA o la activación de la caspasa-3 (Joyce et al., 2001; Cheng et al., 2003; Mosnier et al., 2003). Además, la apoptosis inducida por el rt-PA mediante la activación de la caspasa 8 es bloqueada también por la APC, ampliando su rango de acción a la vía extrínseca de la apoptosis (Liu et al., 2004). Resulta muy llamativo que, aunque la trombina es también capaz de activar al receptor PAR-1, en la situación de un endotelio activado, los efectos finales de ambas proteínas son diferentes (Riewald et al., 2005). Por otra parte, también se ha descrito que la APC promueve la estabilización de la barrera endotelial mediante el estímulo de la síntesis de la esfingosina-1-fosfato (S1P) (Feistritz et al., 2005), un esfingolípido estabilizador del esqueleto celular, aumentado así el repertorio de funciones que presenta esta proteína.



Las acciones anti-apoptóticas y anti-inflamatorias de la APC se producen vía la activación del PAR-1 mediante la unión de la APC a su receptor EPCR. Tomada de Mosnier et al, 2007.

Todas estas características de la APC la convierten en una potencial diana terapéutica de especial interés en el ictus. Resulta interesante que en el estudio epidemiológico prospectivo ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) se encontró que la proteína C parecía proteger frente al ictus isquémico con una OR 0,65 IC95% 0,4-1,0 (Folsom et al., 1999). En modelos murinos de isquemia focal cerebral, la APC ha mostrado que tiene un efecto neuroprotector y antiinflamatorio (Cheng et al., 2003; Shibata et al., 2001; Fernández et al., 2003). De forma muy prometedora, la administración combinada de APC y rt-PA, reduce los efectos neurotóxicos inducidos por el rt-PA en un modelo murino *in vitro* e *in vivo* inhibiendo la apoptosis en las neuronas y células endoteliales (Liu et al., 2004; Cheng et al., 2006). Igualmente, se ha demostrado que la APC previene la hemorragia inducida por rt-PA tanto *in vitro*, reduciendo la expresión de MMP-9 en células endoteliales cerebrales humanas, como *in vivo* (Cheng et al., 2006). Así, se ha sugerido que la utilización de esta proteína podría expandir la estrecha ventana terapéutica del rt-PA (Griffin et al., 2006). De hecho, ya está en marcha un estudio en fase II, el Activated Protein C in Acute Stroke Trial (APCAST) para probar su eficacia y seguridad (Identificador ClinicalTrials.gov: NCT00533546).

La utilización de APC recombinante también aparece de forma prometedora en otros campos, como el tratamiento de la sepsis grave. En modelos murinos de sepsis, Kerschen y colaboradores mostraron cómo una APC recombinante (rAPC), que mantenía las propiedades citoprotectoras pero sólo un 10% de la actividad anticoagulante de la APC endógena, fue tan efectiva como la forma endógena en reducir la mortalidad (Kerschen et al., 2007). Sin embargo, cuando una forma recombinante de APC se administró en humanos frente a placebo, como en el ensayo clínico PROWESS (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), el principal efecto secundario observado fue la hemorragia grave (2,1% vs. 0,7%; $p < 0,01$) (Bernard et al., 2001). En la misma línea, datos de un reciente meta-análisis que evaluaba la seguridad y eficacia de la r-APC en 4.911 pacientes con sepsis mostraron que los pacientes tratados tenían una mayor incidencia de hemorragia grave (RR=1,48; IC95% 1,07–2,06; $p=0,02$) (Martí-Carvajal et al., 2008). Los efectos secundarios hemorrágicos de la APC recombinante serían preocupantes en el

contexto de su administración a pacientes con ictus, más si son tratados además con rtPA. Afortunadamente, las acciones anticoagulantes y citoprotectoras de la APC se ejercen gracias a vías diferentes y por tanto, la síntesis de diferentes variantes recombinantes con una acción anticoagulante disminuída (Mosnier et al., 2004; Guo et al., 2009; Wang et al., 2009), manteniendo las propiedades citoprotectoras, serían sin duda más seguras desde el punto de vista clínico. Muy recientemente se ha publicado que la administración tardía de APC recombinante, entre las 72 y las 144 horas tras el inicio de la isquemia, en un modelo murino de isquemia cerebral transitoria tratado con rtPA, promueve la neurogénesis y la angiogénesis, vía la activación del PAR-1 (Thiyagarajan et al., 2008).

1.2.4 BIOMARCADORES Y PRONÓSTICO DEL ICTUS ISQUÉMICO

1.2.4.1 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON EL PRONÓSTICO DEL ICTUS

El pronóstico de los pacientes con enfermedad cerebrovascular aguda es importante no sólo como información para el paciente y la familia sino también para planificar el manejo del enfermo. Así mismo, esta información puede resultar valiosa a la hora de estratificar los pacientes que van a ser incluidos en ensayos clínicos que pretendan estudiar el impacto de una determinada medida terapéutica en la evolución del paciente con ictus.

Numerosas moléculas relacionadas con los procesos inflamatorios se han estudiado en relación a la gravedad y pronóstico del ictus isquémico. Así, el TNF-alfa, una citoquina que induce activación del endotelio, se encuentra elevado en LCR y en suero tras el inicio del ictus agudo, asociándose con el deterioro neurológico precoz y el mal pronóstico funcional en pacientes con infartos lacunares (Castellanos et al., 2002). También el nivel plasmático elevado de la citocina IL-6, es un factor independiente de progresión en todos los subtipos de ictus y de mortalidad precoz (Rallidis et al., 2006).

Otro marcador de inflamación, la proteína C reactiva (PCR), se ha asociado con el mal pronóstico funcional a largo plazo cuando se halla elevada en la fase aguda. Además, en la fase hiperaguda de pacientes que reciben terapia trombolítica, la PCR es un excelente predictor independiente de mortalidad (Montaner et al., 2004). Por el contrario, niveles elevados de la prostaglandina antiinflamatoria 15-Dpgj2 se han relacionado con un mejor pronóstico tras el ictus, aunque esta asociación sólo se ha encontrado en el subgrupo de pacientes con ictus de origen aterotrombótico (Blanco et al., 2005). En la misma línea, otra molécula anti-inflamatoria, la adiponectina, cuando se encuentra a niveles bajos ($<4\mu\text{gr/mL}$) en las primeras 24 horas tras el ictus, se asocia a un riesgo relativo de fallecimiento de 8,1 (IC95% 3,1-24,5; $P<0,001$) comparado con los individuos que presentan niveles elevados ($>7\mu\text{gr/mL}$) (Efstathiou et al., 2005).

En cuanto a otras moléculas no inflamatorias, se ha descrito que en la fase subaguda de la isquemia cerebral, los mecanismos de apoptosis o muerte celular programada participan activamente en el daño neuronal. En dichos procesos de apoptosis tiene gran importancia la familia de las caspasas, y en especial dos de sus miembros, las caspasas 3 y 7 (caspasas ejecutoras), que se ponen en marcha tras estímulos isquémicos moderados, lo que las hace relevantes en la zona de penumbra. Recientemente, nuestro grupo ha encontrado que los niveles plasmáticos elevados de caspasa 3 a las 24 horas tras el ictus se relacionan con el crecimiento de la lesión isquémica en las secuencias de difusión de la RM cerebral en la fase aguda del ictus y con un peor pronóstico neurológico (Rosell et al., 2008).

En cuanto a las MMPs, no sólo están implicadas en la transformación hemorrágica del infarto sino que pueden tener también un papel como potenciales biomarcadores del pronóstico en el ictus. También hemos hallado diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de MMP-9 y la evolución clínica de los pacientes con infarto cerebral de origen cardioembólico. Además existe una correlación positiva entre los valores medios de MMP-9 y el volumen del infarto cerebral medido en la TC craneal realizada a las 48 horas del inicio de la clínica (Montaner et al., 2001).

Recientemente, Katan y colaboradores, estudiando un grupo de 362 pacientes con ictus isquémico, han encontrado que, los niveles basales de copeptina elevados se relacionan con un peor estado funcional (mRS ≥ 3) y mayor mortalidad en el tercer mes tras el ictus utilizando un modelo de regresión logística. La copeptina es uno de los fragmentos proteicos que se desprenden durante el procesamiento que experimenta la provasopresina para dar lugar a la vasopresina, hormona que participa en la respuesta de estrés estimulando el eje hipotálamo-hipofisario (Katan et al., 2009).

En el año 2009, Whiteley y colaboradores realizan una revisión sistemática sobre los biomarcadores que se habían publicado relacionados con el pronóstico del ictus. Estos autores encontraron relevantes 70 biomarcadores, publicados en un total de 82 estudios, relacionados principalmente con la inflamación, la hemostasia, el daño glial, la excitotoxicidad y la función cardíaca. Sin embargo, observan que en general los estudios son de tamaño pequeño, puede existir un sesgo de publicación que limita las conclusiones que se pueden extraer de la literatura y muchos estudios no ajustaron sus modelos de regresión por variables que se asocian con el pronóstico, como la edad o la severidad clínica. Además cabe destacar que los estudios no han aportado información añadida a las modelos predictivos que utilizan exclusivamente variables clínicas (Whiteley et al., 2009).

Así que, por el momento, seguimos sin disponer de un biomarcador o panel de biomarcadores que nos ayude a predecir el pronóstico del paciente durante la fase inicial del ictus. Esta información es útil, puesto que habitualmente, tanto el paciente como los familiares solicitan al clínico datos sobre el pronóstico durante las primeras horas de la evolución clínica, siendo una cuestión que genera gran incertidumbre en esa situación. Por otro lado, el mejor conocimiento del pronóstico del paciente permitiría quizá gestionar de una forma más adecuada los recursos sanitarios, como la ocupación de las camas de una Unidad de Ictus o las medidas de rehabilitación administradas. Además, a nivel de investigación, la utilización de biomarcadores pronósticos

podría contribuir a la estratificación de los pacientes en algunos ensayos clínicos de medidas terapéuticas.

1.2.4.2 OSTEOPONTINA (OPN)

La osteopontina (OPN) es una proteína de la matriz extracelular, rica en ácido aspártico y glicosilada en su extremo terminal, que puede ser fosforilada en los residuos serina o treonina dependiendo del tipo celular que la secreta (Giachelli et al., 1995; Giachelli et al., 2000). También se conoce como SPP1 (secreted phosphoprotein 1) y en el adulto sano se expresa en los huesos, riñones y células de estirpe epitelial (Giachelli et al., 2000). De forma fisiológica, OPN actúa como un potente inhibidor de la mineralización de los tejidos blandos, evitando el depósito de calcio ectópico y, en este sentido, se considera un inhibidor inducible de la calcificación vascular (Speer et al., 2002). Además cumple otras funciones, puesto que es una molécula de adhesión que contribuye al reclutamiento de monocitos-macrófagos en los focos de inflamación y al mismo tiempo, se considera una citocina soluble que regula la producción de otras citocinas en los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T (O'Regan et al., 2000). En este sentido, se ha clasificado OPN como una citocina T1-helper y se ha localizado de forma específica en macrófagos y linfocitos CD4+ (Standal et al., 2004). Su función de reclutamiento de células inflamatorias está probablemente mediada a través de sus dominios de adhesión, siendo especialmente relevante un dominio que contiene la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD) y que interacciona con varias integrinas de la superficie celular, entre ellas la alfa-4-beta-1 integrina (Bayless et al., 1998).

Además, OPN participa en los procesos de remodelado y reparación de tejidos dañados (Giachelli et al., 1994; Graf et al., 1997; Liaw et al., 1997). En concreto se considera necesaria para una correcta organización de la red de fibrillas de colágeno en la matriz extracelular (Liaw et al., 1998). Por otro lado, varios estudios han mostrado como OPN es fragmentada por dos tipos de proteasas, la trombina y las MMPs, incluyendo la MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 (Agnihori et al., 2001) y MMP12 (Hou et al., 2004). Así, en experimentos *in*

vitro, los fragmentos originados por la proteólisis pueden mantener las funciones de adhesión y exponer nuevos dominios activos que podrían cumplir otras funciones (Yokosaki et al., 1999; Senger et al., 1994).

A nivel clínico, los niveles elevados de OPN se han relacionado con varias enfermedades neoplásicas (Fedarko et al., 2001; Singhal et al., 1997) e inflamatorias, incluyendo la enfermedad cardiovascular (Giachelli et al., 1995). Puesto que es una citocina proinflamatoria, se encuentra sobreexpresada en múltiples enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad de Crohn (Agnholt et al., 2007), la artritis reumatoide (Ohshima et al., 2002), la sarcoidosis (Carlson et al., 1997) y la aterosclerosis (Giachelli et al., 1995). Varios estudios apuntan a que OPN podría tener un papel en la formación de la placa de ateroma y en la progresión de la enfermedad vascular ateromatosa. De hecho, en ratas se encontró un incremento de OPN, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en células de músculo liso procedentes de carótidas lesionadas comparadas con arterias sanas (Giachelli et al., 1993). Otro estudio mostró que la sobreexpresión forzada de OPN favorecía el engrosamiento de la capa media y la formación de la neoíntima tras una lesión vascular, correlacionándose los niveles de OPN con la proliferación y migración de las células de músculo liso y con la producción de MMPs (Isoda et al., 2002). Estos datos indican que, tras el daño vascular, OPN parece modular la proliferación, migración y acúmulo de células de músculo liso y células endoteliales implicadas en la reparación y remodelado de los vasos sanguíneos. Por otro lado, los niveles de OPN se asocian de forma significativa y proporcional con el grado y extensión de la enfermedad cardiovascular en humanos (Ohmori et al., 2003), independientemente de los factores de riesgo vascular clásicos. También se han asociado los niveles plasmáticos elevados de OPN con la restenosis de las arterias coronarias (Kato et al., 2006) y con la presencia de aneurismas de la aorta abdominal (Golledge et al., 2007).

A otro nivel, OPN parece desempeñar un papel tras el daño cerebral (Ellison et al., 1998; Iwanaga et al., 2008). OPN comienza a expresarse a las 24 horas en la glía de la zona peri-isquemia y a las 48 horas en la zona isquémica, según un estudio realizado en un modelo de isquemia cerebral focal

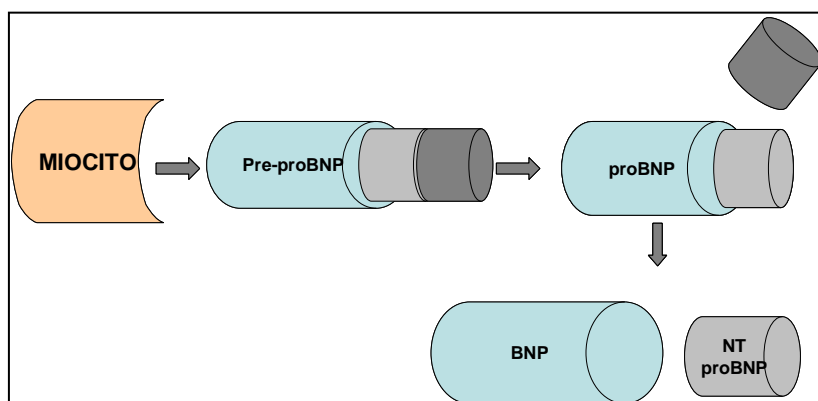
permanente en ratas espontáneamente hipertensas, sugiriendo un papel en la reparación de la lesión cerebral. Además, se postula que OPN puede ejercer una función de neuroprotección apoyándose en modelos experimentales de isquemia *in vitro* e *in vivo* (Meller et al., 2005; Doyle et al., 2008). Especialmente los fragmentos que resultan de la acción proteolítica de la trombina sobre OPN se ha comprobado que tienen mayor capacidad neuroprotectora que OPN intacta (Doyle et al., 2008). Es interesante resaltar que, aunque el nivel de OPN se ha encontrado elevado en diferentes enfermedades inflamatorias y su expresión aumentada en las placas de ateroma, el diseño de este tipo de estudios no permite establecer una relación de causalidad. Con esto, aunque los niveles elevados de OPN aparezcan en enfermedades inflamatorias y se relacionen con la extensión de la enfermedad o incluso con el pronóstico, es posible que su incremento constituya un esfuerzo frustrado de ejercer una función protectora. Por otro lado, tampoco conviene olvidar que OPN es una molécula pleiotrópica que, además de participar en la inflamación, forma parte de los mecanismos de remodelado de la matriz extracelular y evita la calcificación ectópica de tejidos, con lo que podría ejercer funciones de signo opuesto en diferentes tejidos, como el sistema cardiovascular o el sistema nervioso central.

1.2.4.3 PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BNP)

El grupo de los péptidos natriuréticos está constituido por 3 moléculas estructuralmente relacionadas que comparten una estructura en anillo compuesta por 17 aminoácidos y una misma función, la de proteger al organismo de la sobrecarga de volumen sanguíneo. El péptido natriurético cerebral (BNP) se sintetiza preferentemente en los ventrículos y, en menor cantidad, en las aurículas y se libera al torrente sanguíneo en salvas, a diferencia del péptido natriurético atrial (ANP), que se sintetiza principalmente en las aurículas y se almacena en gránulos intracitoplasmáticos hasta su liberación ante estímulos externos, como por ejemplo el ejercicio físico (Yasue et al., 1994, Yoshimura et al., 1993). Una vez liberadas, ambas moléculas actúan como hormonas cardíacas, a distancia, y ejercen su acción de control de la presión arterial y de la homeostasis provocando vasodilatación,

natriuresis y diuresis (Nakao et al., 1992). Por otro lado, el péptido natriurético de tipo C (CNP) se sintetiza sobre todo en las células endoteliales y en el parénquima cerebral y ejerce su acción a nivel local o de forma paracrina (Ogawa et al., 1994).

En condiciones fisiológicas, el estiramiento de la pared ventricular, producido por una expansión del volumen sanguíneo o un incremento en la presión arterial, favorece la síntesis de pre-proBNP, la molécula precursora del BNP en los miocitos ventriculares, que será posteriormente procesada dando lugar al proBNP y después al BNP activo junto con el fragmento amino terminal inactivo (NTproBNP) (Daniels et al., 2007).



La figura muestra el procesamiento que siguen los precursores del BNP para dar lugar a la forma activa de la proteína.

El BNP ejerce su acción mediante la unión al receptor de péptidos natriuréticos de tipo A (NPR-A). Este receptor pertenece a la familia de las guanilato ciclasas y activa una vía de señalización celular a través de la síntesis del segundo mensajero monofosfato de guanidina cíclico (GMPc). El efecto biológico del BNP activo, como el del resto de péptidos natriuréticos, se opone a la acción vasoconstrictora y antidiurética del sistema renina-angiotensina-aldosterona y termina produciendo la relajación del miocardio (Nakagawa et al., 1995). Por otro lado, también ejerce un efecto local de remodelado del ventrículo y se considera un factor antifibrótico derivado del cardiomiocito (Tamura et al., 2000). En otro orden, el BNP desempeña un papel en el desarrollo óseo, puesto que se ha observado que los ratones

transgénicos que sobreexpresan BNP desarrollan deformidades esqueléticas, como escoliosis y extremidades anormalmente alargadas (Suda et al., 1998). En cuanto a su eliminación, el aclaramiento plasmático de los péptidos natriuréticos se realiza por medio del receptor NPR-C y además por la acción de varias enzimas (Walther et al., 2004). Una de las enzimas que juega un papel fundamental en la degradación del BNP, cuya vida media es de aproximadamente 20 minutos, es una endopeptidasa neutra que rompe el anillo de 17 aminoácidos (Daniels et al., 2007).

A efectos prácticos, tanto el BNP como el NTproBNP pueden utilizarse como biomarcadores para fines similares, puesto que tienen un buen nivel de correlación, aunque conviene recordar que presentan algunas diferencias. El BNP tiene una vida media más corta, de unos 20 minutos, mientras que la vida media del NTproBNP es de 1-2 horas, haciendo que esta molécula tenga menores fluctuaciones plasmáticas (Daniels et al., 2007). Por otro lado, los niveles de ambas moléculas están elevados en pacientes con insuficiencia renal, habiéndose descrito que sus niveles empiezan a elevarse cuando el filtrado glomerular desciende por debajo de $60\text{ml}/\text{min}/1,7\text{ m}^2$ (Vickery et al., 2005). Sin embargo, los niveles de NTproBNP parecen depender más de la función renal que los de BNP y, por tanto, son más difíciles de interpretar en los pacientes con insuficiencia renal (Tsutamoto et al., 2006; Richards et al., 1998). Por otra parte, el nivel plasmático de ambas proteínas está influenciado por la edad y el sexo, encontrándose más elevados en las mujeres y en las personas de mayor edad (Redfield et al., 2002; Wang et al., 2002).

Actualmente, tanto la determinación de BNP como de NTproBNP se consideran biomarcadores consolidados en el diagnóstico del paciente con disnea aguda. En este sentido, en un grupo de 1586 pacientes atendidos en urgencias por disnea aguda, los niveles de BNP plasmático $>100\text{pg}/\text{ml}$ presentaron una sensibilidad del 90% y una especificidad del 76% para el diagnóstico de fallo cardíaco como causa del problema respiratorio (Maisel et al., 2002). En el mismo sentido, el estudio PRIDE (ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department), realizado en un grupo de 600 pacientes, propuso un punto de corte de $300\text{pg}/\text{ml}$ de NTproBNP para

descartar la presencia de fallo cardiaco, siendo la sensibilidad y especificidad de esta molécula muy elevadas y el área bajo la curva de 0,94 (Januzzi et al., 1995). Además, otro tipo de estudios, como el BASEL (BNP for Acute Shortness of breath Evaluation) (Mueller et al., 2004) y el IMPROVE-CHF (Improve Management of Patients With Congestive Heart Failure) (Moe et al., 2007) han demostrado que la determinación en urgencias de ambos biomarcadores son además coste-eficaces en el manejo del paciente con disnea. Sin embargo, la elevación de BNP no es patognomónica de fallo cardiaco y así, se han descrito otras situaciones clínicas en las que el BNP se encuentra elevado, como por ejemplo el síndrome coronario agudo, en el que el incremento de BNP parece traducir el grado de la disfunción del ventrículo izquierdo (Morita et al.1993); el tromboembolismo pulmonar, posiblemente relacionado con la sobrecarga del ventrículo derecho (Kucher et al., 2003); la fibrilación auricular (Ellinor et al., 2005) o las situaciones de alto gasto cardiaco, como la sepsis (Rudiger et al., 2006) o el hipertiroidismo (Schultz et al., 2004). Sin embargo, la concentración de péptidos natriuréticos que presentan estos pacientes nunca alcanza un nivel tan elevado como en el fallo cardiaco y en todo caso, se han propuesto niveles de corte más altos en varias de estas situaciones, como la fibrilación auricular, en la que sería necesario un nivel de BNP > 200pg/ml para el diagnóstico de fallo cardiaco (Knudsen et al., 2005). También se han descrito situaciones en las que el nivel de BNP puede descender, como son la presencia de obesidad (Mehta et al., 2004) o el fallo cardiaco que tiene su origen por encima del ventrículo izquierdo, como es el caso de la ruptura de la válvula mitral o la pericarditis restrictiva (Leys et al., 2005).

Además de un biomarcador útil en el diagnóstico, se ha estudiado el valor del BNP en el pronóstico de diversas situaciones clínicas. Así, tanto en el fallo cardiaco agudo como crónico, se ha observado que un incremento de 100pg/ml en los niveles plasmáticos de BNP se asocia a un aumento en el riesgo de muerte del 35% (Doust et al., 2005). Por otra parte, en un grupo de 1085 pacientes con enfermedad coronaria estable que fueron seguidos por un periodo medio de 2,5 años, el nivel plasmático elevado de BNP y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo se mostraron como predictores

independientes de la aparición de nuevos eventos cardiovasculares (Schnabel et al., 2006). Incluso se ha sugerido que el BNP permitiría detectar aquellos pacientes que están en riesgo de sufrir una muerte súbita de origen cardíaco, tanto en pacientes con insuficiencia cardíaca (Berger et al., 2002) como en aquellos que han sufrido un infarto de miocardio (Tapanainen et al., 2004). En el contexto de la enfermedad valvular cardíaca, los péptidos natriuréticos tendrían un papel en la estratificación del riesgo, la decisión de intervención quirúrgica y la monitorización tras realizar la misma (Daniels et al., 2007).

En cuanto a la enfermedad cerebrovascular, Nakagawa y colaboradores describieron que los niveles de BNP se encontraban elevados en la fase aguda del ictus isquémico (Nakagawa et al., 2005). Así mismo, el nivel de NTproBNP se mostró elevado en 57 pacientes con ictus isquémico agudo respecto a los controles y este nivel era mayor en los pacientes con ictus que afectaba al cortex insular o con isquemia miocárdica concomitante (Iltumur et al., 2006). En la misma línea, se describió una elevación del NTproBNP en las primeras 12 horas tras el inicio de los síntomas que persistía hasta el sexto día tras el ictus en un pequeño grupo de 30 pacientes que fueron comparados con 30 controles (Giannakoulas et al., 2005). Al igual que en otros contextos clínicos, en los pacientes con ictus se ha descrito que el nivel de BNP puede ayudar a identificar pacientes con fallo cardíaco (Campbell et al., 2005b; Koenig et al., 2007), con isquemia miocárdica silente (Wong et al., 2006) o con fibrilación auricular no detectada en el momento del ictus (Okada et al., 2009). También el NTproBNP se asoció de forma independiente con la aparición de un infarto de miocardio entre los pacientes con ictus participantes en el estudio PROGRESS (Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study) (Campbell et al., 2005). Por otro lado, en pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica sin enfermedad cardíaca evidente, el nivel de BNP en la fase aguda se ha correlacionado positivamente con el volumen del infarto cerebral y el grado de la afectación neurológica, medida con la escala NIHSS (Tomita et al., 2008).

El papel que el BNP puede tener como biomarcador en la clasificación etiológica del ictus quedó demostrado en un estudio que incluyó 707 pacientes con ictus isquémico (Montaner et al., 2008). En este estudio, los niveles de

BNP >76 pg/mL resultaron ser predictores independientes de la etiología cardioembólica (OR 2,3 IC95% 1,4-3,7, $p=0,001$) junto con el D-dímero, la presencia de fibrilación auricular y de otras cardiopatías cardioembólicas y el infarto completo de la circulación anterior (TACI). De forma similar, Rodríguez-Yáñez y colaboradores encontraron que el nivel de proBNP >360 pg/ml se asoció a la etiología cardioembólica (OR 28,51 IC95% 5,90-136,75; $p<0,0001$) en un grupo de 262 pacientes con ictus isquémico.

Respecto al pronóstico de la enfermedad vascular cerebral, tanto los niveles de ANP como BNP se han mostrado predictores independientes de mortalidad tras la aparición de un primer ictus (RR 4,3 $p<0,01$; RR 3,9 $p<0,01$) en una cohorte de 51 pacientes que fue seguida durante 44+/-21 meses (Mäkikallio et al., 2005) y se ha descrito que el BNP >240 pg/ml es un factor independiente de mortalidad intrahospitalaria entre los pacientes que ingresan con un ictus agudo (Shibazaki et al., 2009). En cuanto a la evolución de la enfermedad cerebrovascular, Campbell y colaboradores estudiaron en una cohorte de 252 pacientes la relación entre los niveles plasmáticos de VCAM1 y NTproBNP y la aparición de un ictus recurrente, encontrando que los pacientes que se encontraban en el cuartil más elevado para los niveles de ambas moléculas tenían 3,6 veces más riesgo de sufrir un ictus recurrente que el resto (Campbell et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Realizar una revisión bibliográfica sobre las moléculas que han sido estudiadas como potenciales biomarcadores en la isquemia cerebral y su utilidad en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes con ictus.

2.2 Determinar si la utilización de un panel de biomarcadores plasmáticos es una prueba útil en el diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular y su diferenciación de otras entidades que simulan un ictus.

2.3 Determinar si la utilización de un panel de biomarcadores plasmáticos es una prueba útil en la diferenciación de la naturaleza isquémica o hemorrágica del ictus.

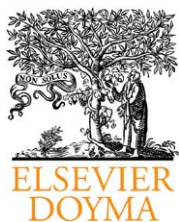
2.4 Determinar biomarcadores plasmáticos que ayuden a predecir la eficacia del tratamiento fibrinolítico.

2.5 Determinar biomarcadores plasmáticos que ayuden a predecir la seguridad del tratamiento fibrinolítico.

2.6 Determinar biomarcadores plasmáticos relacionados con el pronóstico de la enfermedad cerebrovascular.

3. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

**3.1 BIOMARCADORES PLASMÁTICOS EN LA ENFERMEDAD
VASCULAR CEREBRAL ISQUÉMICA. Hipertens riesgo vasc.
2009. doi:10.1016/j.hipert.2008.07.001**



Hipertensión y riesgo vascular

www.elsevier.es/hipertension



REVISIÓN

Biomarcadores plasmáticos en la enfermedad vascular cerebral isquémica

M. Mendioroz Iriarte, E. Cuadrado Godia y J. Montaner Villalonga*

Laboratorio de Investigación Neurovascular, Unidad Neurovascular, Servicio de Neurología, Institut de Recerca, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 9 de julio de 2008; aceptado el 21 de julio de 2008

PALABRAS CLAVE

Biomarcador;
Ictus;
Metaloproteinasas;
Citocinas

Resumen

La utilización de biomarcadores plasmáticos está siendo cada vez más aceptada en la práctica clínica. En el caso del ictus isquémico, la determinación de diferentes moléculas que participan en la cascada isquémica o en los eventos moleculares subsiguientes, podría ser de gran utilidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica. La respuesta inflamatoria desencadenada por la isquemia desempeña un papel destacado, asociándose las citocinas proinflamatorias (interleucina [IL]-1, IL-6 o factor de necrosis tumoral alfa) a un mayor daño cerebral y las anti-inflamatorias (IL-10) a un efecto neuroprotector. Las quimiocinas (IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos 1 [MCP-1]) y las moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular, molécula de adhesión a la célula vascular, molécula de adhesión leucocitaria endotelial, Antígeno asociado a función de linfocitos 1 [LFA-1]) responsables del reclutamiento y adhesión de leucocitos, que liberan diversas proteasas en la zona afectada, también juegan un papel en el ictus isquémico.

La identificación de predictores de transformación hemorrágica tras el tratamiento trombolítico es de gran relevancia, puesto que el riesgo de hemorragia todavía limita la aplicación de activador tisular del plasminógeno (t-PA) en la práctica. En este sentido, las MMP (*matrix metalloproteinases* 'metaloproteinasas de la matriz') son moléculas clave, puesto que participan en la degradación de la lámina basal, y se ha demostrado que el t-PA es capaz de activar la MMP-9 «in vivo» en modelos animales y se ha encontrado sobreexpresión de la MMP-9 en zonas de transformación hemorrágica en cerebros humanos. Otras moléculas, como la fibronectina y los inhibidores endógenos de la fibrinólisis (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1) podrían servir también para predecir la transformación hemorrágica. El empleo de varias de estas moléculas como biomarcadores plasmáticos en el ictus

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: 31862jmv@comb.es (J. Montaner Villalonga).

isquémico está cada vez más cerca de la aplicación clínica y aportará una valiosa información diagnóstica y pronóstica, pudiendo además ayudar en la toma de decisiones terapéuticas en el futuro.

© 2008 SEHLELHA. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Biomarker;
Stroke;
Metalloproteinases;
Cytokines

Plasma biomarkers in ischemic cerebral vascular disease

Summary

Use of plasma biomarkers is gathering increasing more acceptance in the clinical practice. In the case of ischemic stroke, measurement of some molecules involved in the ischemic cascade or in the subsequent molecular events could prove to have great diagnostic, prognostic and therapeutic utility. The ischemia-related inflammatory response plays an important main role, since pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 or TNF- α) are associated with brain damage and anti-inflammatory cytokines (IL-10) seem to be associated to a neuroprotective effect. In addition, chemokines (IL-8, MCP-1) and cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, LFA-1), which are involved in leukocyte recruitment, that may release proteases in the injured area, also play a role in ischemic stroke.

Identifying predictors of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy is also very important in the field, since risk of brain hemorrhaging still limits the use of t-PA treatments. In this sense, matrix metalloproteinases (MMPs) are key molecules involved in basal lamina degradation that are activated by t-PA "in vivo" in animal models and are over-expressed in human brain hemorrhagic areas. Moreover, other markers such as fibronectin and endogenous fibrinolysis inhibitors (TAFI, PAI-1) might be useful hemorrhagic predictors as well.

Use of several of these potential plasmatic biomarkers might be incorporated into daily clinical practice in the near future in order to improve diagnosis, prognosis and therapeutic decisions in ischemic stroke.

© 2008 SEHLELHA. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El empleo de biomarcadores plasmáticos es ya una práctica clínica habitual en algunas áreas de la Medicina. La toma de decisiones basada en los resultados de dichos biomarcadores está ampliamente aceptada en diversas situaciones como, por ejemplo, la decisión de iniciar tratamientos hipolipemiantes en función del nivel plasmático de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el diagnóstico de un infarto de miocardio (troponinas) o la exclusión de un tromboembolismo pulmonar (dímero D). Afortunadamente, estas aproximaciones se están empezando a plantear también en el campo de la patología neurovascular y existen biomarcadores que se podrían emplear para identificar el riesgo de aparición y recurrencia de enfermedad neurovascular, así como para predecir el pronóstico clínico individual durante la fase aguda del ictus (fig. 1).

Actualmente, en las unidades de ictus trabajamos con varios modelos de enfermedad neurovascular (i.e. reperfusión de infartos silvianos mediante activador tisular del plasminógeno (t-PA) con control de recanalización de la arteria cerebral media mediante Doppler transcraneal, y de lesión cerebral, mediante resonancia), en los que el análisis de líquidos biológicos permitirá unir el trabajo de laboratorio y el clínico para intentar dar respuesta a múltiples preguntas que los exámenes físicos, la anamnesis y otros métodos diagnósticos convencionales no han sabido responder. Para descubrir biomarcadores que nos ayuden a tomar decisiones en la práctica clínica frente a un paciente que acaba de sufrir un ictus es imprescindible conocer los

procesos bioquímicos y fisiopatológicos que se desencadenan tras la isquemia cerebral.

Eventos moleculares en la cascada isquémica

Los eventos moleculares iniciados tras la isquemia cerebral pueden ser resumidos como una cascada tiempo-dependiente que conduce a la depleción de energía (pérdida de adenosintrifosfato) a niveles tan bajos que altera la homeostasis iónica celular. Esta disrupción de los gradientes iónicos a través de las membranas celulares (salida de potasio, entrada de sodio, cloro y calcio) favorece la producción de edema citotóxico. Además, la liberación de neurotransmisores, como el glutamato, incrementa aún más el calcio citosólico libre que mediante la activación de diferentes enzimas conduce a procesos de destrucción celular. Diferentes productos contribuyen a incrementar este daño isquémico, como el acúmulo de peróxidos lipídicos tóxicos y de radicales libres. Finalmente, si la obstrucción del flujo no se resuelve, se terminará produciendo un centro de tejido necrótico (*core* del infarto) rodeado de otro hipóxico y potencialmente salvable (penumbra).

Por otro lado, la respuesta inflamatoria juega un papel fundamental en la isquemia cerebral. La expresión local de citocinas inflamatorias (TNF- α [*tumor necrosis factor- alpha* 'factor de necrosis tumoral alfa'], interleucina [IL]-1 β , IL-6) y quimiotácticas (IL-8, MCP-1 [*monocyte chemoattractant protein-1* 'proteína quimiotáctica de monocitos 1']) promueven el reclutamiento y la migración de neutrófilos y macrófagos a la zona de lesión tisular¹, incrementando el

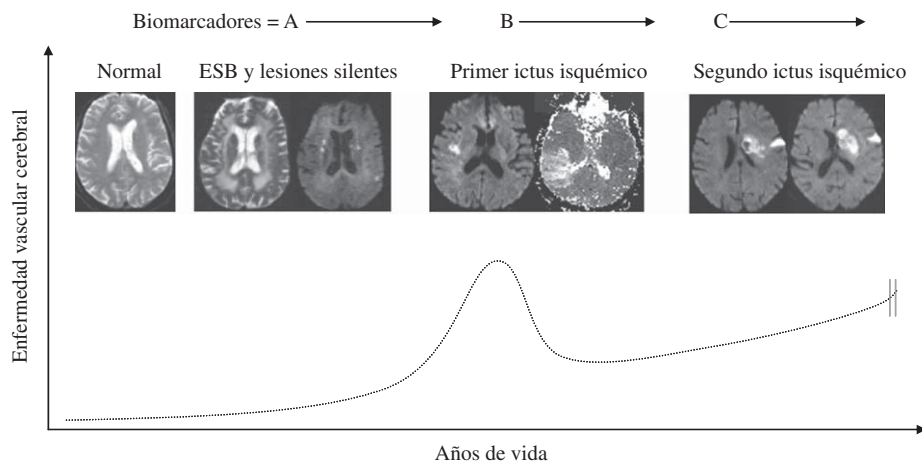


Figura 1 Aplicaciones de los biomarcadores en la enfermedad vascular cerebral. Los biomarcadores plasmáticos podrían ser útiles en el manejo de distintas fases de la enfermedad vascular cerebral; así, por ejemplo, en una primera fase en ausencia de enfermedad o ante enfermedad silente (A) nos podrían ayudar a predecir la aparición de un ictus; en la fase aguda (B) serían de utilidad en el diagnóstico bioquímico del ictus, para identificar subtipos etiológicos y como marcadores pronósticos; y finalmente, pasada la fase aguda (C), los biomarcadores podrían ayudar a predecir la aparición de recurrencias o de resistencia a tratamientos antiagregantes.

daño por los efectos reológicos de los leucocitos atrapados en la microcirculación (el *plugging* leucocitario) y por la liberación de productos citotóxicos de los leucocitos activados (generación y liberación de radicales libres)². Uno de los efectos finales deletéreos es el aumento de la permeabilidad endotelial, en el que juegan un papel fundamental las metaloproteinasas de la matriz (MMP), una familia de enzimas proteolíticas (Zn-dependientes) que fisiológicamente se encargan del remodelado de la matriz extracelular. Entre las MMP, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9) son capaces de digerir la lámina basal endotelial, el constituyente principal de la barrera hemoencefálica (BHE). Recientemente la MMP-2 y/o MMP-9 han sido implicadas por diversos autores en isquemia cerebral^{3,4}. Los neutrófilos que se acumulan en la zona isquémica emplean la producción de algunas de estas MMP para migrar a través del endotelio⁵ y mediante este mecanismo desestructuran la BHE, lo que contribuye a la producción de edema y facilita la transformación hemorrágica del infarto.

Además, es interesante resaltar que no todo el daño se produce de forma precoz tras el ictus. Recientemente se ha demostrado que los mecanismos de apoptosis o muerte celular programada participan activamente en el daño neuronal tardío tras la isquemia cerebral. En los procesos de apoptosis tiene gran importancia la familia de las caspasas, y en especial dos miembros de esta familia: caspasas 3 y 7 (caspasas ejecutoras), que se ponen en marcha tras estímulos isquémicos moderados, lo que las hace relevantes en la zona de penumbra. Entre los inhibidores de la apoptosis que se activan en la isquemia están Bcl-2 y la proteína inhibidora de apoptosis⁶.

Biomarcadores e inflamación tras el ictus isquémico en el ser humano

Desde el punto de vista clínico, algunos de los fenómenos inflamatorios que hemos comentado han podido ser estu-

diados tras el ictus isquémico en el ser humano y podrían empezar a ser aplicados con fines diagnósticos y pronósticos.

Citocinas

En general, podemos decir que las citocinas proinflamatorias, IL-1 y TNF- α , parecen exacerbar el daño cerebral isquémico, y que las moléculas antiinflamatorias como la IL-10 y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra) parecen tener un efecto neuroprotector.

La expresión del ARN mensajero de IL-1 β en células periféricas mononucleares mostró un incremento entre los días 1 a 3 tras el inicio de los síntomas, normalizándose entre los días 20 a 31, y se correlacionó con el grado de alteración neurológica⁷. También las concentraciones plasmáticas de IL-1ra están elevadas en pacientes dentro de la primera semana tras el ictus, en comparación con los controles⁸.

La producción de IL-6 tras el ictus se ha relacionado con el tamaño del infarto⁹. La IL-6 estimula la síntesis de fibrinógeno por los hepatocitos, por lo que los valores de fibrinógeno o el recuento de leucocitos son algunos de los reactantes de fase aguda que están aumentados tras el ictus. La IL-6 en plasma y en líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron factores independientes de progresión para todos los subtipos de ictus¹⁰. En ese estudio, el nivel de IL-6 en plasma se relacionó con componentes de la reacción de fase aguda como temperatura, glucosa y fibrinógeno, que también se han relacionado con la progresión del infarto. Recientemente se ha descrito que el nivel de IL-6 en plasma en las primeras 12 h tras el ictus isquémico es un potente predictor independiente de mortalidad precoz¹¹.

El TNF- α se encuentra sobreexpresado en tejido cerebral de pacientes con ictus y aparece primero en el *core* del infarto y después en áreas periinfarto¹². Las concentraciones de TNF- α se encuentran elevadas en la fase aguda del ictus isquémico, tanto en LCR como en suero¹³. En pacientes con infartos lacunares, niveles elevados de TNF- α se

asociaron a deterioro neurológico precoz y mal pronóstico funcional¹⁴.

El ARN mensajero del TGF- β -1 (*transforming growth factor beta 1* 'factor de crecimiento tisular beta 1') y sus niveles de proteína se encuentran elevados en tejido cerebral tras el ictus, especialmente en los márgenes del infarto¹⁵. Este hallazgo podría explicar el papel neuroprotector de TGF- β -1 en la penumbra isquémica. Aunque se reportó un descenso sérico de las concentraciones de TGF- β -1¹⁶, otro estudio reciente no ha demostrado diferencias en los niveles de TGF- β -1 respecto a un grupo control¹⁷.

La citocina antiinflamatoria IL-10 es neuroprotectora en isquemia cerebral focal experimental y tras el ictus un elevado número de células mononucleares secretan IL-10¹⁸. También se han detectado concentraciones elevadas de IL-10 en el LCR tras la fase aguda del ictus¹⁹. Otro dato a favor del efecto protector de IL-10 es el hecho de que sujetos con baja producción de esta citocina, tienen un mayor riesgo de padecer un ictus²⁰.

Aunque otras citocinas (interferones [IFN], IL-2, IL-4, IL-16, IL-17, etc.) podrían tener un papel destacado en la regulación del proceso inflamatorio tras la isquemia cerebral, apenas disponemos de estudios clínicos que las hayan valorado.

Quimiocinas

Existe un incremento sistémico de ARN mensajero de IL-8 en células mononucleares de sangre periférica y en las concentraciones plasmáticas de IL-8 en pacientes con ictus. También se piensa que esta quimiocina juega un papel fundamental en el reclutamiento de neutrófilos a la zona de isquemia cerebral. Además, las concentraciones de IL-8 son mayores en LCR que en plasma, lo que sugiere que una parte importante de su producción proviene del sistema nervioso central (SNC)⁷. Las concentraciones de IL-8 en LCR difieren entre pacientes con grandes infartos afectando sustancia gris y pequeños infartos de la sustancia blanca. Parece que en los primeros podría tener un papel deletéreo y en los segundos, neuroprotector¹⁹.

La MCP-1 es una potente proteína quimiotáctica para monocitos, tiene un papel destacado en la infiltración del tejido isquémico por monocitos/macrófagos y se ha descrito un incremento de MCP-1 en LCR durante la fase aguda del ictus²¹.

Moléculas de adhesión

Varios estudios han valorado la sobreexpresión de estas moléculas en muestras de sangre periférica tomadas de 12 a 72 h tras el inicio del ictus. Algunos de estos estudios encontraron concentraciones elevadas de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1* 'molécula de adhesión intercelular'), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1* 'molécula de adhesión a la célula vascular'), E-selectina y P-selectina o de la expresión de CD18 o CD11a sobre los leucocitos.

Cabe destacar que los resultados de estos estudios no han ido siempre en la misma dirección, quizás por no ser éstos

del todo comparables (diferentes subtipos de ictus, distintos tiempos de obtención de muestras, distintos métodos de ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay], falta de corrección por tratamientos antiagregantes o antiinflamatorios, etc.).

Las concentraciones de ICAM-1 soluble (sICAM-1) están elevadas y alcanzan los niveles más altos dentro de las primeras 24 h del ictus²² y en la fase hiperaguda los niveles altos se relacionan con deterioro neurológico en la primera semana tras el ictus²³. Las concentraciones de sVCAM-1 se elevan entre los días 1 y 5²⁴ con un pico máximo al quinto día²². Una elevación transitoria de las concentraciones circulantes de la sELAM-1 (*soluble endothelial leucocyte adhesion molecule-1* 'molécula de adhesión leucocitaria- endotelial soluble 1') también ha sido descrita²⁵. El descenso en los niveles de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en los 4 primeros días tras el ictus se ha asociado a una mejor evolución del estado neurológico²⁶.

Pocos estudios han confirmado estos aspectos histopatológicamente en el ser humano. En uno de esos estudios se han encontrado células inflamatorias positivas para ICAM-1 y antígeno asociado a función de linfocitos 1 (LFA-1) (CD11a) en infartos recientes²⁷.

Metaloproteinasas

Recientemente hemos demostrado que los niveles plasmáticos de algunas MMP permiten predecir la evolución del infarto cerebral. Existen diferencias significativas entre los pacientes con niveles altos de MMP-9 correspondientes al grupo de empeoramiento clínico y los pacientes con niveles bajos de MMP-9 en el grupo de mejoría clínica²⁸. Existe una correlación positiva entre los valores medios de MMP-9 y el volumen del infarto cerebral medido en la tomografía computarizada (TC) craneal realizada a las 48 h del inicio de la clínica.

También hemos encontrado relaciones estrechas entre la expresión de MMP y la duración y extensión de la oclusión arterial. Así, los niveles más altos de MMP-9 y de MMP-2 se observan en aquellos pacientes con una oclusión proximal del tronco de la arteria cerebral media (ACM) que persiste ocluida durante todo el período del estudio. El hecho de que la expresión de MMP dependa del tiempo que la arteria permanece ocluida, permite plantear la hipótesis de que a mayor duración de la oclusión de la ACM se produce un mayor infarto cerebral mediado, al menos en parte, por la acción proteolítica de las MMP.

De hecho, diversos estudios experimentales demuestran de forma elegante esta secuencia de acontecimientos, ya que se observan reducciones importantes del tamaño del infarto tras la administración de inhibidores de MMP²⁹, tras el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra la MMP-9³⁰ y en ratones deficientes para MMP-9³¹.

Como biomarcadores de transformación hemorrágica, estas moléculas también han despertado un gran interés, especialmente en el campo de la trombolisis. Pese al claro beneficio clínico del tratamiento trombolítico con t-PA dentro de las 3 primeras horas tras el inicio de los síntomas de un ictus isquémico, su uso en la práctica clínica no se ha generalizado. El incremento en el riesgo de aparición de hemorragia intracraneal sintomática (HICS) puede ser una

de las razones de que menos de un 5% de los ictus isquémicos reciban t-PA en la actualidad. Por tanto, identificar los predictores de HICS podría ayudar a seleccionar a aquellos pacientes que mejor responderán al tratamiento, limitar las complicaciones e incluso ampliar la ventana terapéutica.

En ocasiones, a pesar de conseguir con éxito la recanalización de la arteria ocluida con la administración del fármaco trombolítico, no se produce mejoría clínica. Ante una isquemia cerebral prolongada, aparte del daño celular irreversible inicial, la reperfusión puede contribuir a empeorar la gravedad de la lesión, ya que los mecanismos de reoxigenación postisquémica pueden mediar la destrucción microvascular, la extravasación de componentes sanguíneos al parénquima y la tan temida transformación hemorrágica.

El estrés oxidativo es un proceso metabólico englobado dentro de la respuesta isquémica, y especialmente en el daño por reperfusión, directamente relacionado con la aparición de HICS. Recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo participa en la rotura de BHE ligado a la activación de MMP³². En este mismo sentido, el α -phenyl-N-t-butyl-nitron, un agente que reduce la cantidad de radicales libres, ha demostrado ser efectivo en reducción de las hemorragias inducidas por t-PA en modelos animales de isquemia cerebral focal³³. Muy recientemente, se ha demostrado que los F2-isoprostanos, radicales libres producto de la peroxidación del ácido araquidónico neuronal, se encuentran elevados en las 6 primeras horas tras el ictus y su nivel se correlaciona con el de MMP-9³⁴. A pesar de estos sugerentes datos, no hay estudios en humanos que hayan valorado el uso de biomarcadores del estrés oxidativo como predictores de HICS.

Parece claro que precediendo a la transformación hemorrágica, se produce un daño dentro de la llamada «unidad neurovascular», que comprende el conjunto formado por las células endoteliales, astrocitos, neuronas y la matriz extracelular en la que estas células interaccionan. Aunque los efectos secundarios inducidos por t-PA son aún poco conocidos, recientemente se ha demostrado que tras la administración directa intraventricular de t-PA en cerebro de ratón, éste se une a LRP (*LDL receptor-related-protein*) incrementando la permeabilidad de BHE³⁵. Además, sabemos que la unión LRP-tPA estaría implicada en el mecanismo de activación de MMP-9³⁶.

Las MMP parecen ser moléculas clave en este proceso de degradación perivascular por existir un mecanismo de activación mediado por t-PA que podría contribuir a la rotura de BHE. Respecto a esta relación entre la administración de t-PA y la activación de MMP-9 «in vivo», sabemos que en modelos de isquemia cerebral en roedores, la administración exógena de t-PA incrementa los niveles de MMP-9, que en los animales deficientes para el gen del t-PA estos niveles decrecen de forma significativa y que la administración exógena de t-PA en los ratones deficientes reinstaura la respuesta de MMP-9 que se produce en los animales control³⁷.

Respecto al humano, sabemos que en pacientes tratados con t-PA se produce un pico de MMP-9 en sangre periférica entre 1 y 3 h después del tratamiento y que éste es más acusado en los casos que posteriormente presentaron complicaciones hemorrágicas³⁸.

Por tanto, parece que si somos capaces de controlar estos efectos secundarios de la administración de t-PA podremos mejorar la seguridad y eficacia de este tratamiento. De hecho, la coadministración de inhibidores de las MMP como el batimastat (BB-94) con t-PA reduce la tasa de complicaciones hemorrágicas³⁹. En esta línea de investigación, recientemente se ha descrito un nuevo inhibidor específico para las gelatinasas (SB-3CT) que, administrado en un modelo de isquemia cerebral focal, bloquea MMP-9 y su actividad reduciendo la degradación de laminina y rescata a las neuronas de la apoptosis⁴⁰.

Los estudios en sangre periférica en humanos confirman algunos de los resultados de modelos experimentales. Sabemos, por diversos estudios, que los niveles de MMP-9 son predictores independientes de complicaciones hemorrágicas⁴⁰. Por otro lado, también se ha demostrado una sobreexpresión de MMP-9 en las zonas de parénquima con áreas de transformación hemorrágica respecto a otras zonas infartadas o al hemisferio contralateral en tejido cerebral humano⁴²; además, esas zonas de transformación hemorrágica están densamente pobladas de neutrófilos MMP-9+ (fig. 2). Recientemente, hemos podido demostrar cómo la administración de t-PA produce una rápida liberación de la MMP-9 contenida en los gránulos de dichos neutrófilos⁴³.

También se ha descrito la implicación de otra metaloproteínasa, la MMP-3, en la transformación hemorrágica tras t-PA utilizando un modelo animal con ratones deficientes para la MMP-3⁴⁴.

Por lo tanto, parece que algunas MMP pueden ser prometedores biomarcadores para la mejor selección de los pacientes candidatos a recibir terapia trombolítica. En un estudio experimental reciente, utilizando un cultivo primario de astrocitos corticales de rata, se demuestra que los activadores del plasminógeno son capaces de inducir la expresión de MMP-9, diferentes quimiocinas y citocinas⁴⁵.

La fibronectina (Fn) puede ser otro interesante biomarcador para el diagnóstico. En este sentido, un estudio reciente demuestra que c-Fn plasmática está elevada en pacientes que presentan complicaciones hemorrágicas inducidas por t-PA, sugiriendo su potencial como predictor de hemorragias parenquimatosas sintomáticas⁴⁶.

Coagulación y fibrinólisis

Otro grupo de moléculas interesantes como biomarcadores son los inhibidores endógenos de la fibrinólisis. Después de un evento isquémico se produce una liberación de inhibidores endógenos de la fibrinólisis al torrente sanguíneo, que podría generar importantes diferencias interindividuales en la capacidad fibrinolítica global bloqueando o potenciando la fibrinólisis mediada por t-PA y el desarrollo de HICS. A favor de esta hipótesis, algunos trabajos han mostrado cómo pacientes que sufrieron una HICS presentaban niveles más bajos del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y más elevados del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), y que la combinación de niveles de PAI-1 <21,4 ng/ml y de TAFI >180% predecía la aparición de HICS⁴⁷. También se ha descrito que la actividad

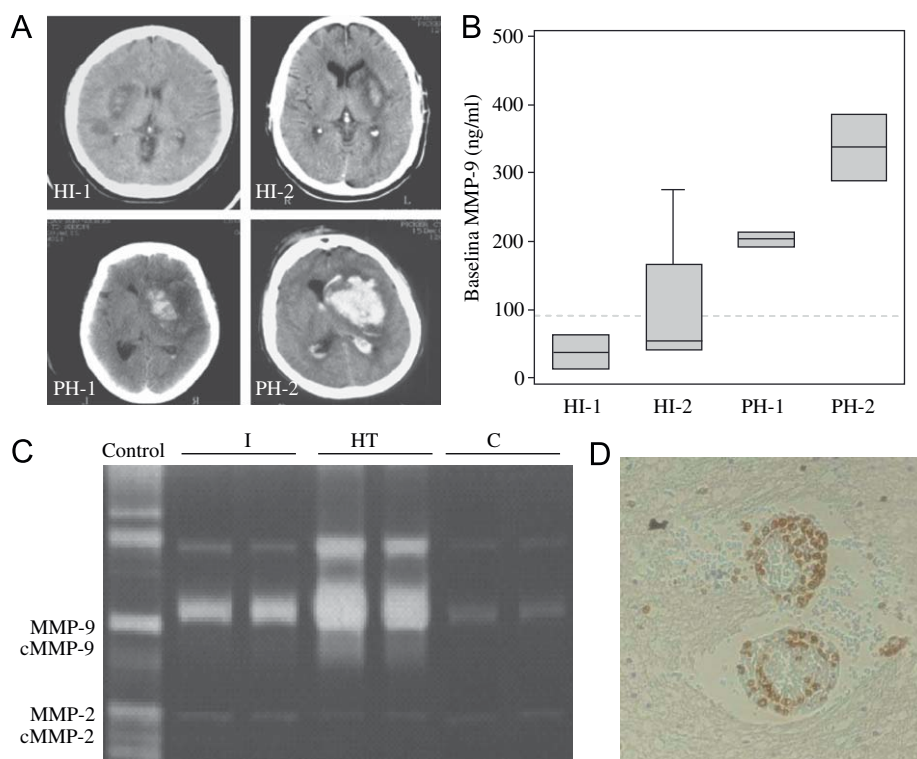


Figura 2 La metaloproteínasa-9 es un biomarcador plasmático predictor de transformación hemorrágica. A) Tipos de transformación hemorrágica tras tratamiento trombolítico. B) La MMP-9 medida a la llegada del paciente a urgencias se halla elevada en aquellos pacientes que van a presentar complicaciones hemorrágicas tras la trombolisis (la línea discontinua indica el límite alto de la normalidad en controles sanos). C) Además de en sangre, también se ha encontrado elevación de MMP-9 en las zonas de TH en parénquima cerebral, en comparación con el *core* del infarto sin TH (I) y el hemisferio sano contralateral (C). Esas áreas de TH son muy ricas en neutrófilos cargados de MMP-9 en sus vesículas (D), que degradan la lámina basal de la microcirculación y ocasionan el sangrado (figura modificada de las citas^{41,42}). MMP-9: metaloproteínasa-9; TH: transformación hemorrágica.

de TAFI se incrementa tras la administración de fibrinolítico en pacientes con ictus isquémico⁴⁸.

Otros biomarcadores

Marcadores de inflamación cuyo uso está más extendido, como la proteína C reactiva (PCR), de la que conocemos su relación con el mal pronóstico funcional a largo plazo cuando se halla elevada en fase aguda, se han valorado recientemente en la fase hiperaguda de pacientes que recibían terapia trombolítica (fig. 3), demostrándose que este marcador es un excelente predictor independiente de mortalidad⁵⁰. Además, en pacientes con isquemia cerebral transitoria, la PCR es un buen predictor de recurrencia de ictus⁵⁰. Por el contrario, niveles elevados de la prostaglandina antiinflamatoria 15-deoxy-PGJ2 se han relacionado con un mejor pronóstico tras el episodio isquémico⁵¹.

En cuanto a otras moléculas no inflamatorias, se ha demostrado que el nivel de la adiponectina, una proteína secretada por los adipocitos con propiedades antiaterogénicas y acción en el metabolismo de la insulina, está disminuido en la enfermedad arteriosclerótica intracraneal con relación al resto de subtipos etiológicos de ictus⁵².

Recientemente, hemos encontrado que los niveles elevados de caspasa 3 medidos a las 24 h tras el ictus se relacionan con el crecimiento de la lesión isquémica en las secuencias

de difusión de la resonancia magnética cerebral y con un peor pronóstico neurológico⁵³.

No hemos de olvidar que éstos son sólo algunos de los marcadores que podemos utilizar en la actualidad para monitorizar al paciente vascular y que otros biomarcadores relacionados con trombosis, como el factor tisular, o con daño endotelial, como la homocisteína, están estrechamente relacionados con los procesos inflamatorios. Así, recientemente se ha mostrado cómo el CD40 ligando, un indicador de la activación plaquetaria, es una especie de puente entre estas familias de marcadores⁵⁴.

Posibilidades futuras del empleo de biomarcadores en el manejo del ictus

En los últimos años se está planteando la posibilidad de hacer un diagnóstico bioquímico del ictus, empleando diversos biomarcadores plasmáticos⁵⁵. Uno de los problemas prácticos de los biomarcadores comentados hasta el momento es que no disponemos todavía de técnicas que permitan medirlos de forma rápida. En la European Stroke Conference (Bologna 2005), se presentó el primer kit de determinación rápida de biomarcadores para el diagnóstico analítico del ictus (Stroke Triage Panel). El mecanismo consiste en la medición rápida (unos 15 min) de los niveles plasmáticos de 4 moléculas clave: proteína S100-B, MMP-9, dímero D y BNP (*brain natriuretic peptide* 'péptido

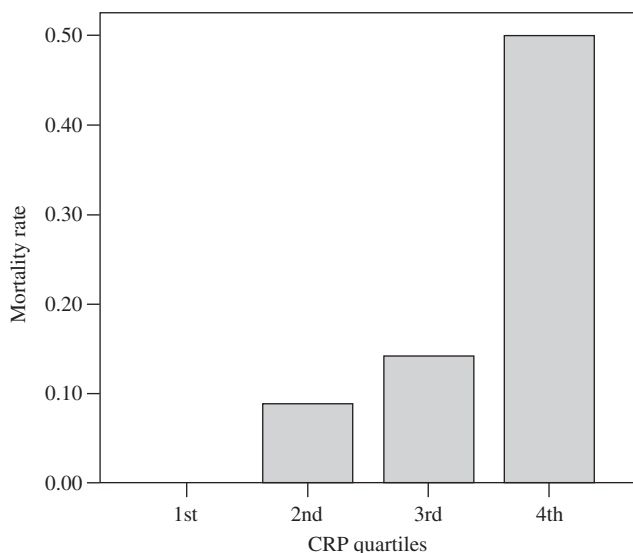


Figura 3 La proteína C reactiva de alta sensibilidad es un biomarcador pronóstico en la fase aguda del ictus. Tasas de mortalidad de los pacientes a los 3 meses tras el ictus según los niveles de PCR (distribuidos en cuartiles). Las tasas de mortalidad se incrementan de forma progresiva para cada cuartil de PCR valorada en la fase hiperaguda (tres primeras horas del inicio de los síntomas) de pacientes con oclusiones de la arteria cerebral media que han recibido tratamiento trombolítico (modificado de la cita⁴⁹). PCR: proteína C reactiva.

natriurético cerebral'). Los resultados se incorporan a un complejo algoritmo que permite confirmar o descartar con elevada sensibilidad y especificidad el diagnóstico de ictus. A la espera de su inminente comercialización en Europa y de las publicaciones que nos permitan conocer mejor la especificidad y sensibilidad del test, su aceptación en el manejo clínico diario constituye una interesante incógnita.

En la misma dirección, un grupo suizo, mediante técnicas de proteómica ha identificado varios marcadores plasmáticos específicos de isquemia cerebral (*ubiquitin fusion degradation protein* [UFD 1], *RNA-binding protein regulatory subunit* [ARN-BP] y nucleoside diphosphate kinase A [NDKA])⁵⁶. Estas aproximaciones desde la proteómica, aunque complejas desde el punto de vista técnico, nos van a dar en los próximos años soluciones al problema de la determinación individual de biomarcadores, ya que de esa forma podremos identificar masivamente qué biomarcadores están implicados en distintas enfermedades neurovasculares, identificar nuevos marcadores de deterioro neurológico o de transformación hemorrágica. De este modo se ha podido identificar a la H-FABP (proteína ligada a ácidos grasos de tipo cardíaco) como un nuevo biomarcador en el ictus isquémico⁵⁷ estudiando el LCR mediante espectrometría de masas. También se ha demostrado que dos moléculas, la apolipoproteína C-I y C-III pueden ayudar a distinguir el ictus isquémico del hemorrágico⁵⁸.

Estos últimos avances parecen indicar que no podemos esperar aproximaciones simplistas y que será necesario combinar varios biomarcadores para responder a las distintas preguntas que nos formulemos en el manejo agudo

del ictus. Una solución intermedia es el uso de *arrays* de proteínas, en que analizamos en una muestra plasmática varios biomarcadores a la vez, mejorando el rendimiento de este tipo de estudios.

Desde el punto de vista técnico, se están demostrando las ventajas y la necesidad de testear estos biomarcadores a nivel del SNC para saber que su expresión procede realmente del parénquima cerebral que sufre los fenómenos isquémicos o hemorrágicos.

Para que el diagnóstico del ictus sea realmente posible empleando biomarcadores, necesitaremos la incorporación de biomarcadores más específicos de isquemia y hemorragia cerebral a los kits de determinación rápida comentados, de forma que nos permitan diferenciar mejor las enfermedades cerebrovasculares de entidades que simulan un ictus. Otra alternativa sería identificar biomarcadores propios de cada una de las condiciones que pueden simular un ictus (tumores, crisis epilépticas, etc.); ello permitiría referir de forma urgente a hospitales especializados sólo aquellos casos que se vayan a beneficiar de un posible tratamiento trombolítico.

Aunque la TC craneal se considera la prueba de elección para el diagnóstico de HICS, una combinación de biomarcadores podría ayudar a diferenciar estas entidades y, por tanto, orientar en la planificación terapéutica hiperaguda. Recientemente, se ha publicado que un marcador glial, GFAP (proteína ácida fibrilar glial) se eleva de forma precoz en la hemorragia intracraneal (HIC)⁵⁹. También nuestro grupo observó que el marcador de daño glial S100b y RAGE (receptor de los productos avanzados de la glucosilación) pueden ayudar en el diagnóstico diferencial rápido entre ictus isquémico y hemorrágico, además de aportar información sobre el pronóstico en la HIC⁶⁰.

Sería también de un gran interés para el clínico poder identificar biomarcadores que nos dieran información etiológica y poder hacer así el diagnóstico diferencial ante ictus isquémicos de etiología desconocida o con varias posibilidades etiológicas. En este sentido, hemos identificado que los pacientes con ictus de etiología cardioembólica tienen niveles más elevados de BNP y dímero D que aquellos con cualquier otro tipo de etiología⁶¹. Este tipo de aproximaciones nos ayudará en el futuro a elegir la terapia de prevención secundaria más adecuada.

Las técnicas actuales de neuroimagen han revolucionado el diagnóstico del paciente neurovascular. De todas formas, hemos de ser conscientes de que las imágenes de resonancia continúan siendo técnicas morfológicas y están carentes de un gran contenido fisiopatológico. Algunos de los biomarcadores comentados en este capítulo predicen la expansión del infarto cerebral^{53,62}, existiendo una correlación entre los niveles de MMP-9 y de MMP-13 con la expansión de la lesión en difusión en las primeras 24 h tras el ictus⁶³.

Aunque interesantes, este tipo de estudios son meramente de asociación, por lo que actualmente se está intentando desarrollar técnicas que además de mostrarnos lo que ocurre en el tejido cerebral isquémico intentan dar información de los fenómenos moleculares de la cascada inflamatoria que están implicados en el proceso isquémico. El objetivo de estas técnicas de imagen molecular es, por tanto, visualizar los fenómenos que ocurren «in vivo» tras la isquemia cerebral. Para ello, se están empleando citocinas radiomarcadas. La mejor técnica para adquirir la señal de estos

radiomarcadores es la gammagrafía cerebral (medicina nuclear molecular).

Finalmente, queda comentar la posibilidad de emplear biomarcadores para guiar el tratamiento del ictus. Actualmente se está planteando que podríamos realizar el control de la eficacia antiagregante, antihipertensiva e hipolipemiante mediante el uso de biomarcadores relacionados con el mecanismo de acción del fármaco empleado. También hay autores que plantean emplear biomarcadores para el control de tratamientos en la fase aguda del ictus (marcadores surrogados). De esta forma, se ha observado que tras la reperusión efectiva del parénquima cerebral se produce un descenso de los biomarcadores proinflamatorios⁶⁴.

Por tanto, parece que si el avance técnico lo permite, pronto tendremos nuevas herramientas en forma de biomarcadores para mejorar el diagnóstico y el pronóstico del ictus, así como para monitorizar el tratamiento y la prevención secundaria de la enfermedad cerebrovascular.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Price CJ, Menon DK, Peters AM, Ballinger JR, Barber RW, Balan KK, et al. Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: An imaging-based study. *Stroke*. 2004;35:1659–64.
- Grau AJ, Berger E, Sung KL, Schmid-Schonbein P. Granulocyte adhesion, deformability and super oxide formation in acute stroke. *Stroke*. 1992;23:33–9.
- 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;29:1020–30.
- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Research*. 1999;842:92–100.
- Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:3189–97.
- Moskowitz MA, Lo EH. Neurogenesis and apoptotic cell death. *Stroke*. 2003;34:324–6.
- Kostulas N, Pelidou SH, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1 β , IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke*. 1999;30:2174–9.
- Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol*. 1995;37:800–4.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the volume of brain lesion in stroke. *Stroke*. 1995;26:1393–8.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:2325–9.
- Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*. 2006;189:193–7.
- Sairanen T, Carpén O, Karjalainen-Lindsberg M-L, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M, et al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke*. 2001;32:1750–8.
- Zaremba J, Skrobanski P, Losy J. Tumor necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomed Pharmacother*. 2001;55:258–63.
- Castellanos M, Castillo J, García MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: A potential therapeutic target. *Stroke*. 2002;33:982–7.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased expression of TGF- β 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*. 1996;27:852–7.
- Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke*. 1996;27:1553–7.
- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffey J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:1863–70.
- Pelidou S-H, Kostulas N, Matusevicius D, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol*. 1999;6:437–42.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, et al. Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol*. 1997;110:492–9.
- Van Exel E, Gussekloo J, De Craen AJM, Bootsma-Van der Wiel A, Frölich M, Westendorp RGJ. Inflammation and stroke: The Leiden 85-plus study. *Stroke*. 2002;33:1135–8.
- Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2001;32:2695–6.
- Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke*. 1998;29:2129–35.
- Wang JY, Zhou DH, Li J, Zhang M, Deng J, Gao C, et al. Association of soluble intercellular adhesion molecule 1 with neurological deterioration of ischemic stroke: The Chongqing Stroke Study. *Cerebrovasc Dis*. 2006;21:67–73.
- Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GYH. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10:277–84.
- Fassbender K, Mössner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1995;26:1361–4.
- Blum A, Khazim K, Merei M, Peleg A, Blum N, Vaispapir V. The stroke trial- can we predict clinical outcome of patients with ischemic stroke by measuring soluble cell adhesion molecules (CAM)? *Eur Cytokine Netw*. 2006;17:295–8.
- Sobel RA, Mitchell ME, Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol*. 1990;136:1309–16.
- Montaner J, Álvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001;32:1759–66.
- Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*. 1997;48:921–6.
- 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;29:1020–30.

31. Asahi M, Asahi K, Jung J, Del Zoppo G, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: Effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1681-9.
32. Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:1393-400.
33. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitron (PBN) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: Combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2001;32:147-53.
34. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke. The biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke.* 2008;39:100-4.
35. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 2003;112:1533-40.
36. Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003;9:1313-7.
37. Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee S, Huang PL, et al. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2005;36:1954-9.
38. Montaner J, Rosell A, Cuadrado E, Fernández-Cadenas I, Del Rio A, Maisterra O, et al. MMP-9-related mechanisms of t-PA-induced haemorrhagic transformation: A genomic, proteomic and histological analysis in human stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25:24.
39. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 2000;31:3034-40.
40. Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2005;25:6401-8.
41. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003;107:598-603.
42. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamón 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.
43. Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamón M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol.* En prensa 2008
44. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1732-9.
45. Lee SR, Guo SZ, Scannevin RH, Magliaro BC, Rhodes KJ, Wang X, et al. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett.* 2007;417:1-5.
46. Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, et al. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2004;35:1671-6.
47. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M, et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2004;35:2123-7.
48. Willemse JL, Brouns R, Heylen E, De Deyn PP, Hendriks DF. Carboxypeptidase U (TAFII) activity is induced in vivo in ischemic stroke patients receiving thrombolytic therapy. *J Thromb Haemost.* 2008;6:200-2.
49. Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA, Ribo M, Huertas R, Rosell A, et al. Post-stroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke.* 2006;37:1205-10.
50. Bang OY, Saver JL, Ovbiagele B, Choi YJ, Yoon SR, Lee KH. Adiponectin levels in patients with intracranial atherosclerosis. *Neurology.* 2007;68:1931-7.
51. Blanco M, Moro MA, Dávalos A, Leira R, Castellanos M, Serena J, et al. Increased plasma levels of 15-deoxyDelta prostaglandin J2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke.* 2005;36:1189-94.
52. Dunac A, Frelin C, Pópolo-Blondeau M, Chatel M, Mahagne MH, Philip PJ. Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34+ cell mobilization. *J Neurol.* 2007;256:327-32.
53. Rosell A, Cuadrado E, Álvarez-Sabín J, Hernández-Guillamón M, Delgado P, Penalba A, et al. Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2008;430:1-6.
54. Grau AJ, Lichy C. Stroke and the CD40-CD40 ligand system: At the hinge between inflammation and thrombosis. *Stroke.* 2003;34:1417-78.
55. Montaner J, Ribo M, Delgado P, Purroy F, Quintana M, Penalba A, et al. A panel of biomarkers may successfully predict acute stroke diagnosis. *Stroke.* 2005;36:419.
56. Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, Burgess JA, Walter N, Hochstrasser DF, et al. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem.* 2005;51:2043-51.
57. Allard L, Lescuyer P, Burgess J, Leung KY, Ward M, Walter N, et al. ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics.* 2004;4:2242-51.
58. Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, Burgess JA, Hughes-Frutiger S, Burkhard PR, et al. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics.* 2004;4:2234-41.
59. Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:181-4.
60. Delgado P, Álvarez-Sabín J, Ribó M, Purroy F, Rosell A, Penalba A, et al. Differentiating ischemic and hemorrhagic stroke by means of a panel of plasma biomarkers. *Cerebrovasc Dis.* 2005;19:63.
61. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A, et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes using plasma biomarkers. *Stroke.* En prensa 2008.
62. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribó M, Chacón P, et al. Plasmatic level of neuroinflammatory markers (Matrix Metalloproteinase-9) predict the extent of diffusion-weighted image lesion in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1403-7.
63. Rosell A, Álvarez-Sabín J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernández-Cadenas I, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke.* 2005;36:1415-20.
64. Montaner J, Álvarez-Sabín J, Chacón P, Molina CA, Barberá G, Abilleira S, et al. Reduction of proinflammatory cytokines, chemokines and metalloproteinases after t-PA treatment for ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2002;13:55.

3.2 A PANEL OF BIOMARKERS INCLUDING CASPASE-3 AND D-DIMER MAY DIFFERENTIATE ACUTE STROKE FROM STROKE MIMICKING CONDITIONS WITH HIGH SPECIFICITY AT THE EMERGENCY DEPARTMENT. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.

A panel of biomarkers including caspase-3 and D-dimer may differentiate acute stroke from stroke mimicking conditions at the Emergency Department

Joan Montaner^{1,2} PhD, MD, Maite Mendioroz¹ MD, Marc Ribó² PhD, MD, Pilar Delgado¹ PhD, MD, Manolo Quintana², Anna Penalba¹, Pilar Chacón³ PhD, MD, Carlos Molina² PhD, MD, Israel Fernández-Cadenas¹ PhD, Anna Rosell¹ PhD, Jose Alvarez-Sabín² PhD, MD.

Neurovascular Research Laboratory¹, Neurovascular Unit². Department of Neurology and Lipid Research Unit³, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Hospital. Barcelona, Spain.

Abstract. Background and aims- At present, the absence of a rapid and widely available diagnostic test for stroke remains a significant limitation in the management of these patients. We aimed to examine the predictive value of a diagnostic panel of blood-borne biochemical markers for stroke diagnosis **Methods and results-** Consecutive patients classified as “strokes” or conditions mimicking stroke “mimics” were evaluated within 24 hours from symptoms onset (n=1005; 915 strokes and 90 mimics). Blood samples were assayed by ELISA for C-reactive protein, D-dimer, soluble receptor for advanced glycation end products, metalloproteinase 9, S100B, brain natriuretic peptide, caspase-3, neurotrophin-3, chimerin and secretagogin. Main independent predictors of stroke versus mimic were: caspase-3 > 1.96 ng/mL (OR=3.32; 95%CI 1.88-5.88, p<0.0001), D-dimer > 0.27 µg/ml (OR=2.97; 95%CI 1.72-5.16; p=0.0001), sRAGE > 0.91 ng/ml (OR=2.19; 95%CI 1.26-3.83, p=0.006), chimerin < 1.11 ng/ml (OR=0.4; 95%CI 0.19-0.81; p=0.011), secretagogin < 0.24 ng/ml (OR= 0.51; 95%CI 0.27-0.97; p=0.041) and MMP-9 > 199 ng/ml (OR=1.66; 95%CI 1.01-2.73; p=0.046). Predictive probability of stroke when those six biomarkers are above/below these cut-offs in the model is 99.01% (0.99 % mimics had such a combination). The best combination of biomarkers in the model was caspase-3 and D-dimer. Similar results were obtained for patients attended within less than 6 and 3 hours from stroke onset. Indeed, a model developed for samples obtained within the first 3 hours showed high sensitivity (Se) and (Sp) (threshold at 25th percentile Se 0.87, Sp 0.55; threshold at 75th percentile Se 0.28, Sp 0.99). **Conclusions:** A combination of biomarkers including caspase-3 and D-dimer seems promising to achieve a rapid biochemical diagnosis of stroke. However, new biomarkers should be incorporated to the panel in order to obtain a test with higher sensitivity to allow this approach to be used as a tool for urgent referral of stroke patients to hospitals where acute treatments are available.

Introduction

Stroke is the third cause of death in developed countries and the leading cause of long-term disability in adults.¹ On average, every 40 seconds someone in the United States has a stroke and this fact generates a considerable burden on patients and society, since the mean lifetime cost of ischemic stroke is estimated at \$140,048.² After an acute ischemic stroke, the use of intravenous tissue plasminogen activator (tPA) has been shown to improve the likelihood of an excellent outcome at 90 days by 30%.³ Nevertheless, it remains still underused because of the narrow therapeutic window since only 15% of patients usually arrive within the first 3 hours after symptoms onset.⁴ Then, the earlier the patient is admitted to the hospital, the better the chance of

recovery. In this regard, rapid stroke testing before admission would certainly improve the patient referral and access to tPA treatment. Moreover, hemorrhagic stroke patients would also benefit from a rapid hospital referral given that an early and intensive blood pressure lowering treatment may provide protection against hematoma growth in the first few hours after onset.^{5, 6}

On the other hand, diagnostic confidence is limited in some cases and this may restrict the use of tPA. Stroke mimicking conditions (mimics) represent a significant proportion (19-31%) of those patients suspected from suffering a stroke^{7,8}, being the most frequent diagnosis postictal state, systemic infection, syncope, brain tumor, migraine and toxic-metabolic disturbances. Even in the case of

expert stroke neurologists evaluation, mimics may be regularly misdiagnosed in the clinical practice.⁹ Performing this kind of blood test in the Emergency Department would help physicians to differentiate real stroke patients from mimics, lowering the uncertainty of the diagnosis and, as a consequence, improving the chance of receiving the thrombolytic treatment.

Therefore, we have designed a set of studies to test the value of a wide panel of plasma biomarkers covering several biological pathways and aimed to improve stroke diagnosis and management. Some secondary objectives have been published elsewhere^{10, 11}, and in the present study we show the value of the panel to differentiate stroke from stroke mimicking conditions.

Methods

Study Population

Patients with a suspicion of acute stroke admitted to the Emergency Department of a teaching hospital were consecutively included during a period of two years. Our target group consisted of patients with an acute stroke or a condition resembling stroke (mimic), admitted within the first 24 hours after symptom onset. This study was approved by the Ethics Committee [PR(AG)89/2003] of the hospital and all patients or relatives gave informed consent.

Clinical Protocol

A detailed history of vascular risk factors and comorbidity was obtained from each patient. To identify the potential mechanism of cerebral infarction, electrocardiogram, chest radiography, carotid ultrasonography, complete blood count and leukocyte differential and blood biochemistry were performed in all patients; when indicated some patients also underwent special coagulation tests, transthoracic echocardiography, brain magnetic resonance imaging, electroencephalography and Holter monitoring. Considering these records and the neuroimaging data, previously defined etiologic subgroups were determined using the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria.¹² Stroke was also classified according to the Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) criteria, based on clinical symptoms, location and extent of cerebral infarction.¹³ Stroke

severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).¹⁴

Vascular and Brain Imaging Protocol

An experienced neurologist performed all transcranial Doppler examinations using a Multi-Dop X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, and vessel occlusions or stenoses were recorded as previously described.¹⁵ Patients received a carotid artery ultrasound (5- and 10-MHz linear probes, Aplio-80, Toshiba) examination to assess the presence and severity of stenosis or occlusion in the extracranial internal carotid and vertebral arteries.¹⁶

On admission, all patients underwent a brain computed tomography (CT) that was reviewed by a neuroradiologist with extensive experience in acute stroke who was blinded to the clinical details and biomarker results.

Treatment Protocol

Standard therapies were given based on stroke characteristics (ischemic or hemorrhagic) and arrival times. Generally speaking, ischemic patients received thrombolytics, antiplatelet agents or anticoagulants, or they were recruited into neuroprotection clinical trials and hemorrhagic patients were monitored and treated following the usual clinical guidelines.

Immunoassays

Blood samples were drawn at Emergency Department arrival to test a panel of biomarkers that included C-reactive protein (CRP), D-dimer (DD), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), S-100b, brain natriuretic peptide (BNP), neurotrophin-3, caspase-3, chimerin, and secretagogin. Blood testing for biomarkers was performed before any treatments were administered to avoid drug-biomarker interference and time of blood sampling regarding symptoms onset timing were recorded. Blood was drawn in EDTA tubes centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and plasma frozen at -80°C until analysis.

All biomarkers were assayed by ELISA. Immunoassays were forward immunometric (sandwich) assays performed in 384-well microtiter plates with a Tecan Genesis RSP 200/8 Workstation (Tecan, Durham, NC, USA). Each sample was tested twice with

biotinylated antibodies (Biosite Inc, San Diego, CA, USA).

Statistical Analyses

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and comparisons were made with SPSS, version 15.0. Biomarkers were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot) and values are expressed as median (interquartile range). Univariate analyses were performed based on the Mann-Whitney U test to assess differences between mimics and stroke patients. Bonferroni correction was used as a method for correcting multiple testing in the univariate analysis. In order to obtain cut-off values with the best sensitivity and specificity for each biomarker, a receiver operator characteristic (ROC) curve was configured.

Biomarkers associated in the univariate analysis were entered into a forward stepwise multivariate logistic regression model to identify independent predictors of stroke versus mimic. Goodness of fit of the multivariate logistic model was tested with the Hosmer-Lemeshow test. A p-value <0.05 was considered statistically significant. The ability of the model to discriminate between stroke and mimicking conditions was assessed by the area under the curve (AUC), considering a result of 0.50 as a model that does not accurately predict stroke and 1.0 as a model that perfectly discriminates between strokes and mimics.

Results

The complete protocol was achieved in 1005 patients. Of these, 915 were strokes and 90 were mimics. Mean age of stroke patients was 72.63 ± 12.46 years and 471 patients (51.5%) were men. Risk factors details are shown in table 1. Of the 90 mimics, 25% had epileptic seizures, 21.7% a brain tumor, 15% migraine, 10% toxic-metabolic disorders and 28.3% showed other mimicking conditions such as syncope, peripheral nervous system diseases or others. Mean age of mimics were 69.57 ± 17.13 years and 56.2% were male. Regarding vascular risk factors 62.2% of mimics had hypertension, 20% diabetes mellitus and 28.9% dyslipidemia. Current alcohol intake was recorded in 4.4% and smoking in 13.3% of mimicking conditions. The presence of previous atrial fibrillation was detected in 11.1%, peripheral artery disease in 4.4% and

coronary disease was present in 6.7% of mimics. Previous ischemic stroke was described in 37% of stroke mimicking patients and 6.5% had a previous hemorrhagic stroke.

Biomarker values for both strokes and mimics are shown in table 2. The biomarkers differentially associated with stroke patients compared to mimics were caspase-3 (2.14 vs. 1.29 ng/mL, $p < 0.001$), D-dimer (0.81 vs. 0.56 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.002$), MMP-9 (267.9 vs. 194.5 ng/ml, $p = 0.019$) and secretagogin (0.15 vs. 0.19 ng/ml, $p = 0.004$). Between clinical variables, just the presence of a previous ischemic stroke was related to the diagnosis of stroke vs. mimics ($p = 0.049$). When applying Bonferroni correction only caspase-3, D-dimer and secretagogin remained associated (p value corrected = 0.005).

Biomarkers which finally were associated with stroke versus mimic after obtaining cut-off values with the best sensitivity (Se) and specificity (Sp) in the ROC curves were caspase-3 > 1.962 ng/mL (Se 52%, Sp 73%), D-dimer > 0.275 $\mu\text{g/ml}$ (Se 81%, Sp 38%), sRAGE > 0.91 ng/ml (Se 48%, Sp 65%), chimerin < 1.11 ng/ml (Se 79%, Sp 32%), secretagogin < 0.24 ng/ml (Se 67%, Sp 48%) and MMP-9 > 199 ng/ml (Se 65%, Sp 53%). Associations of the biomarkers with risk factors and stroke severity are shown in table 3. Interestingly, many of the tested biomarkers tended to be higher among older people and females.

Finally, after performing logistic regression model, those biomarkers independently associated with stroke versus mimic were caspase-3 > 1.962 ng/mL [OR (CI 95%) 3.32 (1.88-5.88), $p < 0.001$], D-dimer > 0.275 $\mu\text{g/ml}$ [2.97 (1.72-5.16), $p < 0.001$], sRAGE > 0.91 ng/ml [2.19 (1.26-3.83), $p = 0.006$], chimerin < 1.11 ng/ml [0.4 (0.19-0.81), $p = 0.011$], secretagogin < 0.24 ng/ml [0.51 (0.27-0.97), $p = 0.041$] and MMP-9 > 199 ng/ml [1.66 (1.01-2.73), $p = 0.046$] (Figure 1). Similar results were found when the logistic regression model was adjusted by age, gender and the presence of a previous stroke. More importantly, when the stroke patients with a blood sample obtained within 3 (n = 153) or 6 hours (n = 330) from stroke onset were selected, we observed nearly the same results in the logistic regression model (Figure 1).

Overall accuracy of the model was 0.91 and the goodness of fit test showed a good adjustment (Hosmer and Lemeshow, $p=0.577$). Predicted probability of stroke in the model with the best combination of the six biomarkers was 99.01%. Figure 2 shows probability of stroke concerning the number of pathological biomarkers associated in the model. When the levels of caspase-3, D-Dimer, sRAGE and MMP-9 were high and secretagogin and chimerin II were low, stroke probability was 100%. Regarding the discriminating ability of the model, the AUC was 0.759 (0.705-0.813) when samples were obtained <24h; AUC=0.810 (0.757-0.863) for samples drawn <6h and AUC=0.797 (0.736-0.857) when samples were collected <3h. The table 4 shows the Se and Sp for the models when the threshold for the logistic regression model was set at the first or the last quartile. Interestingly, when samples were obtained <3 hours after onset and the first quartile was selected as the cut-off point, the model showed a relatively high Se (Se 0.87; Sp 0.55). On the other hand, when the last quartile was chosen as the cut-off point, the Sp was very high (Se 0.28; Sp 0.99) and similar results were found for samples obtained <6 hours. Moreover, using combinations of those biomarkers that showed the best association in the model (caspase-3 and D-Dimer) and stroke, we may look for models with the best sensitivity or the best specificity as shown in Figure 3.

Discussion

Although diagnostic tests based on blood markers are commonly used for cardiac disorders, for example, BNP for the diagnosis of heart failure, and troponin I for the diagnosis of myocardial infarction,¹⁷ biomarkers use in the stroke field is still incipient.^{18,19} Blood biomarkers enable physicians to reach quickly an accurate diagnosis and this achievement may be of extreme importance in Emergency Departments, where some treatments must be initiated as early as possible in order to improve the patient outcome. This is the case of stroke patients who, if early identified, may benefit from tPA treatment. On the other hand, some patients with a focal neurological deficit may show other conditions, such as tumors or seizures. These patients are not going to benefit from the fibrinolytic

treatment and even undesirable adverse effects could appear if the drug is administered. Certainly, a widely available blood test for stroke patients would help neurologists to reach an accurate and prompt stroke diagnosis, improving the therapeutic management of these patients, or what is more important from a screening perspective, the result of such a test might guide paramedical personnel to decide an urgent referral of patients to hospitals within the first minutes after the symptoms onset.

The results of our study indicate that the measurement of plasma biomarkers might be useful for distinguishing stroke from mimicking conditions. A panel of six biomarkers, including caspase 3, D-dimer, sRAGE, chimerin II, secretagogin and MMP-9, permits to reach accurate diagnosis of stroke when the best combination is present. The best association between biomarkers in our model was observed in the case of combining caspase-3 and D-dimer. Even more, when only those two biomarkers were used, the probability of stroke reached more than 70%.

Caspase-3 is a cysteine protease that plays an effector role in apoptosis, a recognized process that occurs in brain parenchyma after ischemia along with necrosis mechanisms.^{20, 21} Following brain ischemia, caspase-3 knockout mice showed smaller infarct volumes than wild-type²², and on the contrary, mice over-expressing human caspase-3 presented increased apoptosis and larger lesion volumes after transient focal cerebral ischemia²³, suggesting a critical role of caspase-3 in ischemic lesion extension. Moreover, our group has previously reported an over-expression of plasma caspase-3 during the first 24 hours after stroke onset. We also found an association between high plasma caspase-3 level, measured 24 hours after stroke onset, and poor neurological outcome together with infarct growth among ischemic stroke patients.²⁴

Interestingly, D-dimer is the most frequently used indicator of blood coagulation activation since D-dimer is a product of degradation of cross-linked fibrin by plasmin.²⁵ We recently reported that high level of D-dimer after stroke is an independent predictor of cardioembolic

etiology¹⁰, confirming previous reports suggesting this proposal²⁶.

Moreover, sRAGE was found to be independently associated with stroke compared to mimic conditions. This association may be explained since soluble sRAGE (sRAGE) has an antiatherogenic role and is decreased in diabetes and hypertension, both risk factors for large- or small-vessel atherothrombotic disease.²⁷ In our study, males, smokers and patients with alcohol intake displayed lower sRAGE levels. Age and severity of stroke were also positively associated with plasma sRAGE level. Nevertheless, after adjustment for these factors, sRAGE remained as an independent predictor of stroke.

As we have previously described, MMP-9, a proteolytic enzyme involved in tissue remodeling and neuroinflammatory mechanisms, is increased during the acute phase of stroke. Furthermore, MMP-9 is associated with hemorrhagic transformation in stroke patients who received tPA treatment²⁸ and correlates with infarct size and clinical deficit. We have also found an over-expression of MMP-9 at different areas of postmortem brain tissue from ischemic and hemorrhagic stroke patients suggesting a contribution of this enzyme to stroke brain injury.²⁹

As a final point, lower levels of secretagogin and chimerin were independent predictors of stroke. Secretagogin is a calcium-binding protein which is expressed in neuroendocrine cells. Gartner and colleagues have found high levels in patients suffering from hypoxic brain injury³⁰ on days 2 and 3 after stroke onset, being proposed as a candidate marker indicative of neuronal damage. Nevertheless, in the present study we show that low secretagogin levels are associated with stroke conditions. This fact might be partially explained by the timing of our blood sample recruitment, since we obtained samples within the first 24 hours after symptoms onset and so we could be missing a protein peak occurring later on.

Advantages of Rapid Stroke Identification

Strength of our study is that the median time between stroke onset and sample collection

for biomarker determination is only few hours. Rapidly differentiating a stroke from a mimic seems interesting. However, which are the characteristics of such a test? The answer might be related to the level of the healthcare system where we want to use such a diagnostic test. If the test is very sensitive for stroke diagnosis, the greatest number of strokes will be detected and this approach would permit rapid and accurate referral of only stroke patients to hospitals where acute treatments are available. Therefore, the model we developed for the first 3 hours, when the threshold was set at the first quartile (table 4), seems appropriate to use in the pre-hospital setting (Se 0.87; Sp 0.55). On the other hand, if the test is very specific, we may be sure that we are in front of a stroke and we may rule out a mimic, which might be more interesting for stroke neurologists in cases of doubts before deciding the therapeutic management. Then, a model with a threshold at the last quartile shows a very high specificity for samples obtained within the first 3 hours after onset (Se 0.28; Sp 0.99) and even within the first 6 hours from symptoms onset (Se 0.39; Sp 0.97).

To sum up, these six biomarkers as a rapid panel blood test might help physicians working at Emergency Departments to confirm stroke diagnosis, so they could start earlier tPA treatment and avoid mimics to be treated with a needless drug. There have been other previous studies searching for biomarkers that differentiate stroke from mimics. Laskowitz and colleagues tested a panel of 5 biomarkers, including brain natriuretic peptide (BNP), C-reactive protein (CRP), D-dimer, MMP-9, and S100B, to differentiate stroke from mimicking conditions in a sample of 130 patients admitted with acute focal neurologic deficits within 6 hours of symptom onset³¹. However, compared to their study, our sample size was far large and we also tested blood samples obtained within 3 hours from symptoms onset, that is the best temporal scenario for the test to guide physicians to start tPA treatment. Later on, a prospective multicenter trial was designed to evaluate a panel of 4 biomarkers (D-dimer, BNP, MMP-9, and S100B), in addition to clinical variables, that recruited 1146 patients within 24 hours of symptom onset for a 3-year period³². Nevertheless, the model showed a moderately discrimination ability with a

sensitivity of 86% and a specificity of 37% for the pooled samples and authors concluded that, although feasible, diagnostic accuracy was not acceptable, mainly because of the low specificity.

Study Limitations

Our study presents several limitations. First, we do not know what the source of our plasma biomarkers is and then, they might be released from neurons or glial cells into the blood stream due to blood brain barrier breakdown or other sources of these markers might exist. In fact, caspase-3 could come from red and white apoptotic circulating blood cells. Therefore, pathological verification of these molecules within brain parenchyma might be of help to assess the brain origin of our markers³³. Although the sample size of our study is large, and probably becomes the largest study on stroke biomarkers, we believe that a larger and more focused study on specific stroke subtypes would be required to test whether the identified biomarkers properly distinguish mimics from all those stroke subtypes. For example, almost 30% of our stroke patients had previous atrial fibrillation, and this might partially account for the increase in D-dimer level in our group of patients. Moreover, this large study leads us to recruit 90 mimics, but there are so many subtypes of mimics that we believe that our results should be validated in different populations including many more numbers and types of mimic conditions and with more sensitive biomarkers incorporated.

Conclusions

From the global project testing a wide panel of biomarkers for the biochemical diagnosis of stroke and of stroke subtypes and etiologies, we may now say that some markers seem useful and others do not add any interesting diagnostic information. Among the most interesting markers are caspase 3 differentiating strokes from stroke mimicking conditions, BNP and D-dimer identifying cardioembolic strokes, and s100b and sRAGE distinguishing ischemic from hemorrhagic strokes. Whether those markers might be combined within a single panel and used in the daily practice has to be further addressed and some requisites and steps should be fulfilled before wide implementation.

The present study suggests that using a combination of six plasma biomarkers, including caspase-3 and D-dimer, may be a feasible tool to distinguish stroke patients from mimicking conditions at Emergency Department. However, a test with almost 100% sensitivity will be needed to allow this approach to be used as a tool for urgent referral of stroke patients to hospitals where acute treatments are available.

Acknowledgements

We thank the emergency department nurses, on-call neurologists, technicians of the core laboratory and all participating stroke patients and their relatives by their continuous support to conduct studies on stroke biomarkers.

Funding Sources

This study was partially funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/322 & 08/361). Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network (RENEVAS, RD06/0026/0010) and the European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213). P.D. and A.R. are supported by Miguel Servet senior research contracts and M.M. by a predoctoral fellowship from the Carlos III Health Institute.

Disclosures

Dr Montaner has received honoraria for speaker's presentations and the Neurovascular Research Laboratory has received a research grant from Biosite Inc. No other authors report disclosures.

References

1. World Health Organization. World Health Report 2002. Geneva, Switzerland: WHO; 2002.
2. Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke*. 1996; 27:1459-66.
3. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333:1581-7.
4. Katzan IL, Hammer MD, Hixson ED, Furlan AJ, Abou-Chebl A, Nadzam DM; Cleveland Clinic Health System Stroke Quality Improvement Team. Utilization of intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Arch Neurol*. 2004; 61:346-50.
5. Ohwaki K, Yano E, Nagashima H, Hirata M, Nakagomi T, Tamura A. Blood pressure management in acute intracerebral hemorrhage: relationship between elevated blood pressure and hematoma enlargement. *Stroke* 2004; 35:1364–1367.
6. Anderson CS. Medical management of acute intracerebral hemorrhage. *Curr Opin Crit Care*. 2009; 15:93-8.
7. Libman RB, Wirkowski E, Alvir J, Rao TH. Conditions that mimic stroke in the emergency department. Implications for acute stroke trials. *Arch Neurol*. 1996;53:404
8. Hand PJ, Kwan J, Lindley RI, Dennis MS, Wardlaw JM. Distinguishing between stroke and mimic at the bedside: the brain attack study. *Stroke* 2006;37:769-75
9. Scott PA, Silbergleit R. Misdiagnosis of stroke in tissue plasminogen activator-treated patients: characteristics and outcomes. *Ann Emerg Med*. 2003;42:611-8.
10. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A, Quintana M, Palacios ME, Molina CA, Alvarez-Sabín J. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke*. 2008; 39:2280-7.
11. Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, Cuadrado E, Ribó M, Rosell A, Penalba A, Fernandez-Cadenas I, Romero F, Molina C, Alvarez-Sabín J. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *Stroke* (submitted)
12. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh 3rd EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in acute stroke treatment. *Stroke*. 1993; 24:35–41
13. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinical subtypes of cerebral infarction. *Lancet*. 1991; 337:1521-1526.
14. Brott T, Bogousslavsky J. Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2000; 343:710-722
15. Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D. Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in acute ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke*. 1995; 26:430–433.
16. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler RE. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis—Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology*. 2003; 229: 340–346.
17. Panteghini M. Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology. *Eur Heart J*. 2004; 25:1187-1196.
18. Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke*. 2004; 35:57-63.
19. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003; 107:598-603.
20. S.T. Hou, J.P. MacManus, Molecular mechanisms of cerebral ischemia induced neuronal death, *Int. Rev. Cytol*. 2002; 221: 93–148.
21. S. Love, R. Barber, G.K.Wilcock, Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2000; 26: 55–66.
22. D.A. Le, Y. Wu, Z. Huang, K. Matsushita, N. Plesnila, J.C. Augustinack, B.T. Hyman, J. Yuan, K. Kuida, R.A. Flavell, M.A. Moskowitz, Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro

- oxygen glucose deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99:15188–15193.
23. L.E. Kerr, A.L. McGregor, L.E. Amet, T. Asada, C. Spratt, T.E. Allsopp, A.J. Harmar, S. Shen, G. Carlson, N. Logan, J.S. Kelly, J. Sharkey. Mice overexpressing human caspase-3 appear phenotypically normal but exhibit increased apoptosis and larger lesion volumes in response to transient focal cerebral ischaemia, *Cell Death Differ.* 2004; 11: 1102–1111.
24. Rosell A, Cuadrado E, Alvarez-Sabín J, Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, Mendioroz M, Rovira A, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Montaner J. Caspase-3 is related to infarct growth alter human ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2008; 430:1-6.
25. Tohgi H, Kawashima M, Tamura K, Suzuki H. Coagulation-fibrinolysis abnormalities in acute and chronic phases of cerebral thrombosis and embolism. *Stroke.* 1990; 21:1663–1667.
26. Ageno W, Finazzi S, Steidl L, Biotti MG, Mera V, Melzi D'Eril G, Venco A. Plasma measurement of D-dimer levels for the early diagnosis of ischemic stroke subtypes. *Arch Intern Med.* 2002; 162:2589-2593.
27. Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1032–1037.
28. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107:598-603
29. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expresión of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006; 37:1399-406.
30. Gartner W, Lang W, Leutmetzer F, Domanovits H, Waldhäusl W, Wagner L. Cerebral expression and serum detectability of secretagogin, a recently cloned EF-hand Ca(2+)-binding protein. *Cereb Cortex.* 2001; 11:1161-9
31. Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1053:30.
32. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke* 2009; 40:77– 85.
33. Sairanen T, Szepesi R, Karjalainen-Lindsberg ML, Saksi J, Paetau A, Lindsberg PJ. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathol.* 2009; 118:541-52.

Table 1. Descriptive analysis of risk factors in the stroke population

Variable	Frequency n=915
Sex (male)	471 (51.5%)
Age, mean \pm SD	72.63 \pm 12.464
Previous ischemic stroke	200 (23%)
Previous hypertension	483 (57.6%)
Diabetes mellitus	222 (26.5%)
Smoking	128 (15.3%)
Enolism	48 (5.7%)
Previous dyslipemia	195 (23.2%)
Previous peripheral arteriopathy	70 (8.3%)
Previous coronary disease	114 (13.6%)
Previous atrial fibrillation	199 (23.7%)
Other previous embolic cardiopathy	47 (5.6%)
Baseline NIHSS score, median (interquartile range)	6 (2-14)
<i>Subtype of stroke</i>	
Ischemic	776 (84.8%)
Hemorrhagic	139 (15.2%)

Table 2: Biomarkers levels among stroke and mimic patients.

Biomarkers	Stroke n=915	MIMIC n=90	P-value
Caspase 3 ng/mL	2.14 (0.97-4.88)	1.28 (0.57-2.50)	<0.001
BNP pg/mL	66.60 (21.61-160.11)	49.1 (0-132.04)	0.101
CRP µg/ml	10.48 (4.52-25.94)	9.99 (3.63-29.55)	0.748
Chimerin II ng/ml	0 (0-0.83)	0 (0-1.46)	0.114
D-Dimer µg/ml	0.81 (0.35-1.95)	0.56 (0.19-1.39)	0.002
MMP 9 ng/ml	267.93 (149.42-468.81)	194.66 (107.58-404.42)	0.019
sRAGE ng/ml	0.89 (0.56-1.44)	0.77 (0.54-1.23)	0.121
S100b pg/mL	62.76 (32.59-130.47)	65.04 (35.78-137.98)	0.878
Secretagogin ng/ml	0.15 (0.07-0.32)	0.19 (0.1-0.49)	0.004

Values are expressed by median (interquartile range)

Table 3 A. Relationship between biomarkers and age, gender and risk factors.

Biomarkers	Age		Sex			Previous stroke			Peripheral arteriopathy			Coronary disease			Atrial fibrillation			Other embolic cardiopathy		
	r	P-value	Female	Male	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value
Caspase-3 ng/mL	0.03	0.242	2.26	1.61	0.001	2.14	1.93	0.503	2.02	1.72	0.427	2.02	1.93	0.442	1.83	2.6	0.002	1.94	4.36	0.002
BNP pg/mL	0.37	<0.001	76.39	50.64	<0.001	64.48	65.35	0.977	64.19	66.28	0.303	57.9	135.41	<0.001	48.65	156.27	<0.001	60.31	143.74	<0.001
CRP µg/ml	0.10	0.001	10.98	9.81	0.271	10.49	9.4	0.701	10.44	10	0.783	9.93	13.08	0.3	9.89	11.73	0.31	10.49	9.38	0.429
Chimerin II ng/ml	0.008	0.811	0	0	0.093	0	0	0.577	0	0	0.725	0	0	0.198	0	0	0.586	0	0	0.76
D-dimer µg/ml	0.41	<0.001	0.99	0.62	<0.001	0.77	1.01	0.06	0.79	0.91	0.394	0.8	0.77	0.867	0.73	1.05	0.001	0.82	0.67	0.209
MMP-9 ng/ml	-0.02	0.458	267.41	256.82	0.666	261.99	255.36	0.973	255.11	292.99	0.476	256.91	260.11	0.273	263.92	254.63	0.994	256.04	269.85	0.705
sRAGE ng/ml	0.12	<0.001	0.97	0.52	<0.001	0.89	0.87	0.875	0.89	0.89	0.718	0.88	0.98	0.126	0.83	1.14	<0.001	0.88	1.24	0.003
S100b pg/mL	0.15	<0.001	76.8	54.41	<0.001	63.09	64.16	0.686	66.06	50.59	0.02	66.97	47.36	0.029	64.29	63.26	0.364	63.55	68.07	0.765
Secretagogin ng/ml	0.10	0.002	0.16	0.15	0.391	0.16	0.15	0.722	0.15	0.18	0.257	0.15	0.15	0.524	0.16	0.13	0.176	0.16	0.09	0.015

r: Pearson correlation coefficient, it has been used when analysing the relationship between age and NIHSS score with biomarkers; Mann-Whitney U test has been for assessing the other risk factors.

Table 3 B. Relationship between biomarkers and risk factors and stroke severity.

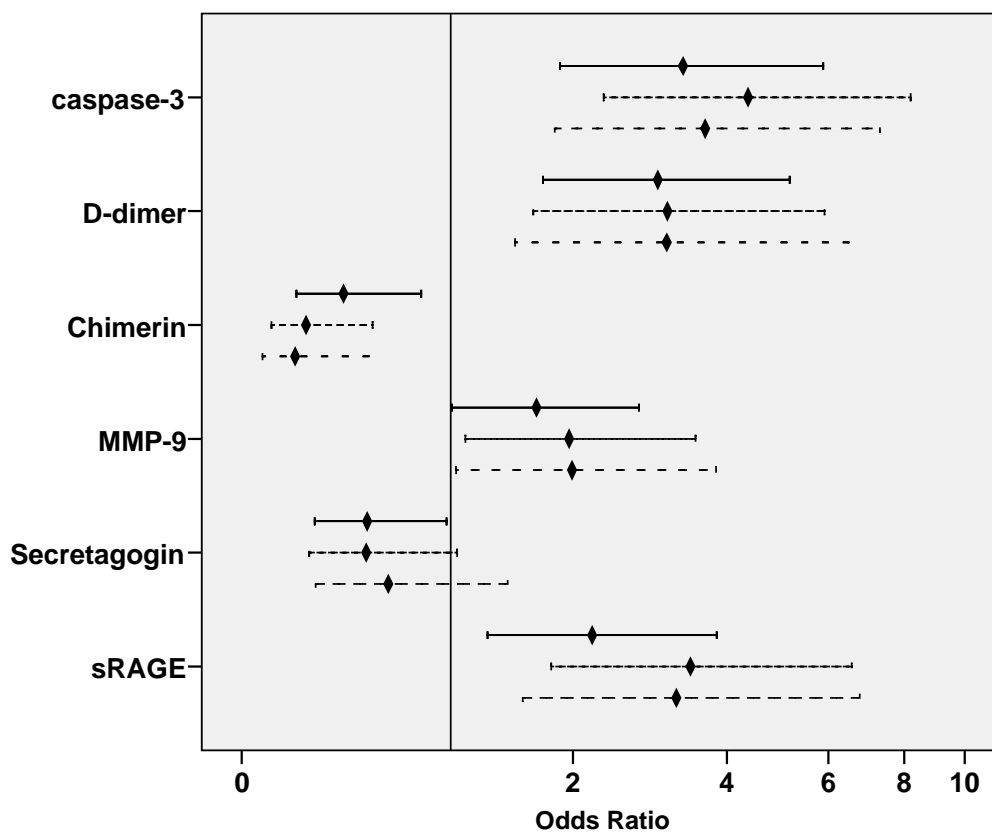
Biomarkers	HTA			Diabetes			Smoking			Enolism			Dyslipemia			NIHSS		Type of ischemic stroke		
	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	No	Yes	p-value	r	p-value	AIT	Establish	p-value
Caspase-3 ng/mL	1.87	2.09	0.544	1.98	1.96	0.814	2.08	1.49	0.009	1.97	2.11	0.939	2.12	1.77	0.25	0.12	<0.001	1.93	2.21	0.302
BNP pg/mL	56.34	68.47	0.198	58.89	72.56	0.117	71.88	25.86	<0.001	65.98	29.41	0.005	69.47	47.98	0.047	0.15	<0.001	55.62	72.39	0.315
CRP µg/ml	8.62	12.3	0.005	10.31	10.49	0.521	10.83	8.98	0.357	10.64	8.74	0.385	9.84	12.21	0.366	0.11	0.002	7.72	11.67	0.02
Chimerin II ng/ml	0	0	0.05	0	0	0.277	0	0	0.002	0	0	0.96	0	0	0.71	-0.02	0.548	0	0	0.649
D-dimer µg/ml	0.79	0.82	0.555	0.82	0.74	0.072	0.92	0.4	<0.001	0.82	0.43	<0.001	0.82	0.7	0.101	0.27	<0.001	0.66	0.89	0.003
MMP-9 ng/ml	237.69	277.82	0.017	279.01	227.88	0.019	256.04	292.81	0.294	261.83	238.77	0.639	257.47	261.66	0.84	0.17	<0.001	248.74	264.34	0.243
sRAGE ng/ml	0.88	0.89	0.478	0.87	0.93	0.207	0.95	0.72	<0.001	0.91	0.67	0.008	0.89	0.86	0.448	0.17	<0.001	0.89	0.91	0.262
S100b pg/mL	63.55	63.98	0.852	64.08	63.34	0.962	70.83	40.71	<0.001	64.36	45.42	0.182	66.49	56.49	0.092	0.25	<0.001	43.6	61.53	0.002
Secretagoin ng/ml	0.17	0.15	0.505	64.08	63.34	0.02	0.16	0.12	0.005	0.16	0.14	0.522	0.16	0.14	0.209	0.009	0.81	0.15	0.15	0.679

r: Pearson correlation coefficient, it has been used when analysing the relationship between age and NIHSS score with biomarkers; Mann-Whitney U test has been used for assessing the other risk factors

Table 4. The table shows the Se and Sp for the models when the threshold for the logistic regression model was set at the first or the last quartile.

Blood Sample Timing	First Quartile			Last Quartile		
	Cut-off point	Sensitivity	Specificity	Cut-off point	Sensitivity	Specificity
<24 hours	0.8748	0.17	0.98	0.9755	0.82	0.59
< 6 hours	0.7112	0.84	0.63	0.9401	0.39	0.97
< 3 hours	0.4915	0.87	0.55	0.8779	0.28	0.99

Figure 1: Biomarkers independently associated with stroke. Logistic regression analysis as a function of time from symptom onset.



——— Logistic regression with samples collected <24h;
 - - - samples collected <6h;
 - . - . samples collected <3h.

Figure 2: Stroke probability regarding the number of associated biomarkers with stroke.

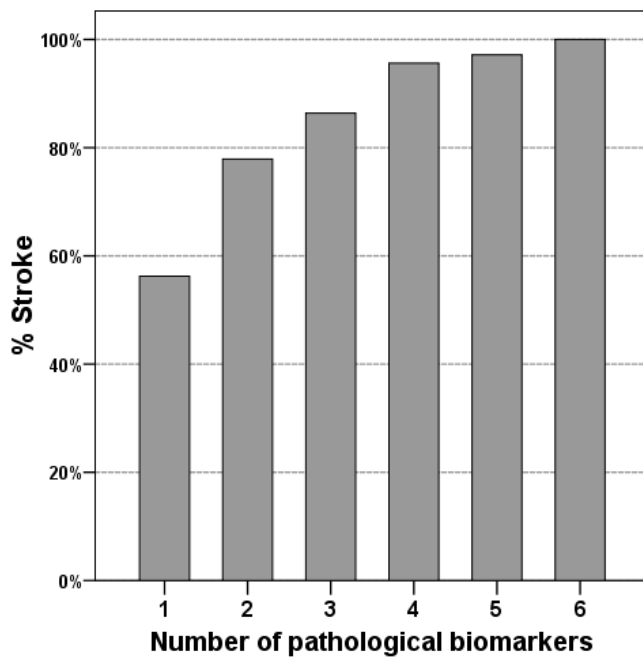
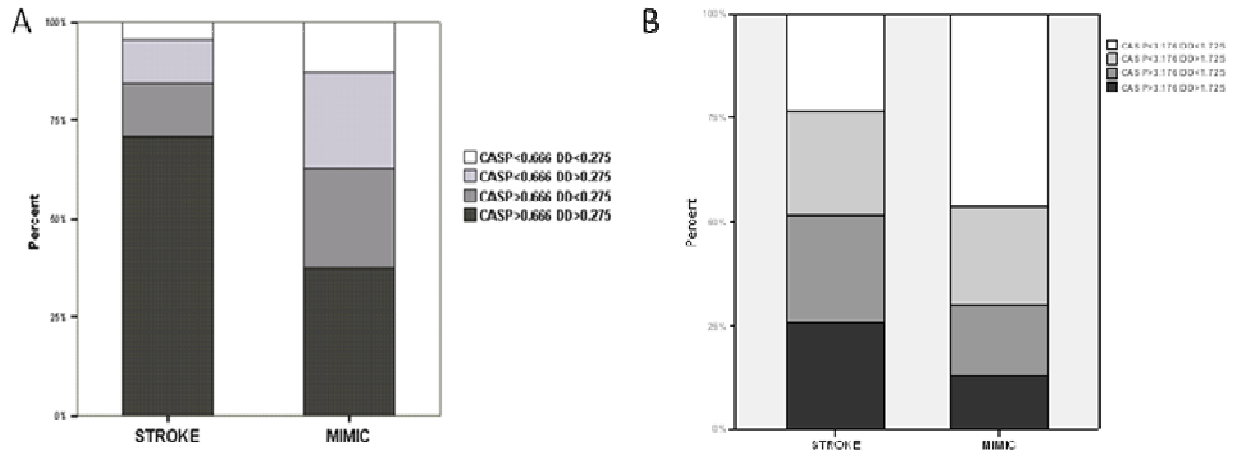


Figure 3: Stroke or mimics probability regarding the combination of Caspase-3 and D-Dimer using cutoffs with optimal sensitivity (A) or specificity (B).



3.3 DIFFERENTIATING ISCHEMIC FROM HEMORRHAGIC STROKE USING PLASMA BIOMARKERS: THE S100B/RAGE PATHWAY. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.

Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway.

Joan Montaner PhD, MD^{1,2}; Maite Mendioroz MD¹; Pilar Delgado PhD, MD¹; Eloy Cuadrado PhD¹; Marc Ribó PhD, MD²; Anna Rosell PhD¹; Anna Penalba¹; Israel Fernandez-Cadenas PhD¹; Francisco Romero PhD, MD³; Carlos Molina PhD, MD²; Jose Alvarez-Sabín PhD, MD².

Neurovascular Research Laboratory¹, Neurovascular Unit and Neurology Department² and Neuroradiology Department³. Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Hospital. Barcelona, Spain.

Abstract

Background- Although neuroimaging is useful in differentiating ischemic from hemorrhagic stroke in the Emergency Department, a wide-available rapid biochemical test would add advantages in the pre-hospital triage and management of stroke patients. **Objective and methods-** Our aim was to examine predictive value of a panel of blood-borne biochemical markers to differentiate ischemic from hemorrhagic stroke. Consecutive patients with acute focal neurological deficit within 24 hours from symptoms onset were evaluated and blood samples were drawn at arrival. Tested biomarkers by ELISA were C-reactive protein, D-dimer, soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE), metalloproteinase 9 (MMP-9), S100B, brain natriuretic peptide, neurotrophin-3, caspase-3, chimerin, secretagogin, cerebellin and neuropeptide Y. **Results-** The complete protocol was achieved in 915 stroke patients [776 ischemic (IS), 139 intracerebral hemorrhage (ICH)]. Higher levels of MMP-9 ($p=0.024$) and S100B ($p<0.001$) were found among ICH. Among patients with blood samples obtained <6 hours from symptoms onset ($n=337$), S100B levels were found to be increased in ICH (107.58 vs 58 pg/mL; $p<0.001$) whereas sRAGE levels were lower in ICH than IS (0.77 vs 1.02 ng/mL; $p=0.009$). In this subset of patients high S100B (OR 3.97 95%CI 1.82-8.68; $p=0.001$) and low sRAGE (OR 0.22 95%CI 0.10-0.52; $p<0.001$) were independently associated with ICH and a model including these biomarkers showed an accurate predictive capacity [area under ROC curve (AUC) =0.839]. A regression tree was created by CART method showing good classification ability (AUC=0.762). Similar results were found for patients with samples obtained within 3h from symptoms onset. **Conclusions-** A combination of biomarkers including those of the S100B/RAGE pathway seems promising to achieve a rapid biochemical diagnosis of ischemic versus hemorrhagic stroke in the first hours from symptoms onset.

Introduction

Of all strokes, 87% are ischemic and 13% are hemorrhagic strokes¹. Overall, the prognosis for intracerebral hemorrhage (ICH) remains poor: 37-38% of hemorrhagic strokes result in death within 30 days, whereas 8% to 12% of ischemic strokes die, according to the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study². Differentiating between both types of stroke is a critical step when planning stroke attention within the first minutes following symptoms onset. In fact, specific management and treatment protocols are recommended for each stroke subtype. For instance, reducing the blood pressure in acute ICH may prevent or delay hematoma growth³ and also decrease the risk of rebleeding⁴, improving the clinical

outcome⁵. On the contrary, lowering blood pressure may be deleterious in ischemic stroke^{6, 7}. Moreover, rapid identification of ischemic stroke allows us to promptly initiate tissue plasminogen activator (tPA) treatment while timely ICH detection may improve the early monitoring and management of these patients.

Ideally, in the pre-hospital setting, individuals who usually perform the initial evaluation such as the emergency ambulance paramedics, might be able to properly classify stroke patients as ischemic or hemorrhagic types and notify the Emergency Department of the imminent arrival of such stroke subtype. Then, an appropriate protocol would be started without

delay. In addition, some therapeutic measurements would be initiated during the transfer of the patient to the hospital.

Although brain CT is usually performed as part of the initial evaluation of a patient with suspected stroke in most hospitals, because of its excellent sensitivity to differentiate ischemic from hemorrhagic stroke⁸, the availability of a rapid biochemical diagnostic test would add clear advantages in the management of stroke patients, particularly if used outside the stroke care centers. Our aim was to examine the predictive value of a panel of blood-borne biochemical markers to differentiate ischemic from hemorrhagic stroke.

Methods

Study Population

Patients with an acute stroke admitted to the Emergency Department of Vall d'Hebron University Hospital within the first 24 hours after symptom onset were recruited during two years. Symptoms onset was defined as the last time the patient was known to be asymptomatic. A total of 1010 consecutive patients on suspicion of stroke were evaluated. Among these, 90 had other conditions mimicking stroke and therefore they were excluded. Finally, 915 patients with an acute confirmed ischemic or hemorrhagic stroke were included in the study.

Neuroimaging and Clinical Protocol

On admission, all patients underwent a brain computed tomography (CT) scan that was reviewed by a neuroradiologist with extensive experience in acute stroke, blinded to clinical details and biomarkers results. This test was used as the reference standard to classify patients into ischemic or hemorrhagic strokes. Demographical data and vascular risk factors profile were obtained. The detailed clinical protocol has been reported elsewhere⁹. Stroke severity was assessed on arrival by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).¹⁰ Standard therapies were given based on stroke characteristics and arrival times. Generally speaking, ischemic stroke patients received thrombolytics, antiplatelet agents, anticoagulants and/or were recruited into neuroprotection clinical trials and hemorrhagic patients were monitored and treated following the usual clinical guidelines. This study was approved by the Ethics Committee [PR(AG)89/2003] of the Vall

d'Hebron University Hospital and all patients or relatives gave informed consent.

Immunoassays

Blood samples were drawn at arrival on the Emergency Department to test a panel of biomarkers including C-reactive protein (CRP), D-dimer (DD), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), S100 calcium-binding protein B (S100b), brain natriuretic peptide (BNP), neurotrophin-3, caspase-3, chimerin, secretagogin and neuropeptide Y (NPY). Blood testing for biomarkers was performed before any treatment was administered to avoid drug-biomarkers interference. Blood was drawn in EDTA tubes, centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and frozen at -80°C. All biomarkers were assayed by ELISA. Immunoassays were forward immunometric (sandwich) assays performed in 384-well microtiter plates with a Tecan Genesis RSP 200/8 Workstation (Tecan, Durham, NC, USA). Each sample was tested twice with biotinylated antibodies (Biosite Inc, San Diego, CA, USA).

Statistical Analyses

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and comparisons were made using SPSS software, version 15.0. Biomarkers were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot) and values were expressed as median (interquartile range). Statistical significance for intergroup differences was assessed by Pearson's chi-square for categorical variables and the Student's t test or Mann-Whitney U test for continuous variables to assess differences between ischemic and hemorrhagic stroke patients. Bonferroni correction was used as a method for correcting multiple testing in the univariate analysis. To obtain cut-off values with the best sensitivity and specificity for each biomarker, a receiver operator characteristic (ROC) curve was configured. A p-value <0.05 was considered significant.

Those biomarkers and clinical variables associated with stroke subtype in the univariate analysis ($p < 0.01$) were entered into a forward stepwise multivariate logistic regression model to identify independent predictors of hemorrhagic versus ischemic stroke. Three models were developed regarding the blood sample was drawn within the first 3, 6 or 24

hours. Goodness of fit of the multivariate logistic models was tested with the Hosmer-Lemeshow test. Discrimination capacity of the models was assessed by ROC curves. The area under the ROC curve (AUC) showed the discriminating ability of the model; an AUC of 0.5 indicates no discrimination, whereas an AUC of 1.0 indicates perfect discrimination.

As a complementary statistical method, we performed a classification and regression tree (CART) analysis to provide a predictive model of stroke subtypes. Through strictly binary splitting, CART method allows the building of inductive decision trees which are useful for creating clinical decision rules and diagnostic categories 11-14. Compared to traditional multivariate techniques, CART is more effective for uncovering complex interactions between predictors¹⁵. All the variables that were entered into the logistic regression model were also included in the CART analysis in a one-step way and the number of patients in terminal nodes was set to a minimum of 100. Predictive accuracy of the tree was assessed by a ROC curve. The CART analysis was performed by the CART Pro v6.0 software (Salford Systems, San Diego, CA, USA). Finally, in order to test if the panel of biomarkers would be feasible and useful in the pre-hospital setting, where clinical variables are not usually readily available, a logistic regression model and a CART algorithm including only biomarkers were developed.

Results

Regarding stroke subtypes, 776 (84.8%) were ischemic and 139 (15.2%) were hemorrhagic strokes. Mean age was 72.6 +/- 12.4 years and 471 patients (51.5%) were men. Demographic characteristics and risk factors details are shown in Table 1. Risk factors associated with hemorrhagic stroke ($p < 0.05$) were younger age, previous hemorrhagic stroke, alcohol intake and lower rates of peripheral arteriopathy, ischemic cardiopathy, atrial fibrillation and dyslipidemia. Patients with hemorrhagic stroke displayed also a higher score in the NIHSS scale at admission than patients with ischemic stroke.

Overall, among studied biomarkers only S100B, sRAGE and MMP-9 showed different levels regarding the type of stroke (Table 2), although when considering the p value adjusted by the Bonferroni correction ($p = 0.0042$) only

S100B remains associated to the type of stroke. Considering the different time points for blood sample extraction, S100B levels were found to be increased in hemorrhagic stroke (107.58 vs. 58 pg/mL; $p < 0.001$) whereas sRAGE levels were lower in hemorrhagic stroke than ischemic (0.77 vs. 1.02 ng/mL; $p = 0.009$) when blood samples were collected within 6 hours. Similar results were found for those patients in whom samples were obtained within 3 hours from stroke onset (Table 2).

The optimal biomarker concentration cut-off points for discriminating between hemorrhagic and ischemic stroke was found to be sRAGE < 0.97 ng/mL and S100B > 96 pg/mL. The model obtained combining both biomarkers, using these cut-off points, showed a specificity of 80.2% (95% CI, 77 to 83), a sensitivity of 22.7% (95% CI, 15.9 to 31%), a positive predictive value of 17.06% (95% CI, 11.9 to 23.7) and a negative predictive value of 85.2% (95% CI, 82.2 to 87.7). Indeed, the percentage of hemorrhagic stroke cases was only of 4% when the test was negative (S100B < 96 pg/mL and sRAGE > 0.97 ng/mL) whereas 42% of patients had an ICH when the test was positive (S100B > 96 pg/mL and sRAGE < 0.97 ng/mL).

The logistic regression analysis showed that gender (male), previous hemorrhagic stroke, coronary disease, atrial fibrillation, dyslipidemia, NIHSS score, high S100B level and low sRAGE level were independently associated with hemorrhagic stroke (Table 3). Among patients with blood samples obtained within 6 and within 3 hours after stroke onset, the association of S100B and sRAGE was consistently found in the final regression model (Table 3). The multivariate models showed good fit adjustment (Hosmer-Lemeshow test, $p > 0.5$ for the three models).

In addition, the discriminating ability of the overall model including biomarkers and clinical variables was good, as shown by the ROC curve with an AUC of 0.767 (CI 95%, 0.719-0.815) (Figure 1.A). The AUC in a model without biomarkers was found to be 0.735 (CI 95%, 0.685-0.785) ($p = 0.366$ for comparison of both ROC curves). When only patients with blood samples drawn within 6 hours after stroke onset were analyzed, the discriminating ability of the model improved, as shown by the ROC curve, with an AUC of 0.839 (CI 95%,

0.781-0.896) (Figure 1.B). This area was larger than the AUC from a model excluding biomarkers [AUC 0.768 (CI 95%, 0.701-0.836)] ($p=0.112$ for comparison of both ROC curves). Interestingly, when patients with blood samples obtained within the first 3 hours were evaluated, the discriminating ability of the model was also accurate, with an AUC of 0.807 (0.725-0.881). This area was significantly much better than a model without biomarkers [AUC 0.589 (0.471-0.708)] ($p=0.003$ for comparison of both ROC curves).

A classification tree was obtained by the CART method (Figure 2) showing that the combined use of just 4 variables, including S100B, sRAGE level, gender and the NIHSS score provided a simple and intuitive algorithm that accurately classified patients with blood samples obtained within 6 hours after stroke into ischemic and hemorrhagic subtypes. The accuracy of the model was good (AUC 0.762) and the result was intuitive and seemed more useful for the clinical practice than the logistic regression model.

Finally, for the subset of patients included during the first 3 hours after onset, a logistic regression model and a CART algorithm both including only biomarkers were developed, trying to ensure the feasibility of such a test in the pre-hospital triage step. A logistic regression model including S100B and sRAGE biomarkers showed an AUC of 0.776 (0.676-0.856) and the obtained CART algorithm was able to predict up to 51.7% of ICH when S100B was above 102.6 pg/mL and sRAGE below 0.97 ng/mL (figure 3).

Discussion

Among a wide panel of biomarkers we have identified high S100B and low sRAGE levels in the blood of ICH patients compared with those presenting with ischemic stroke, making this test attractive in the pre-hospital triage step and in the Emergency Department as a tool for stroke subtypes diagnosis.

In fact, some authors have already described biomarkers aiding in this direction such as low ApoC-I and ApoC-III¹⁶ or glial fibrillary acidic protein (GFAP)¹⁷, which was substantially raised in patients with ICH within the first 6 hours from stroke onset. It is highly interesting that this protein is also a glial marker such as S100B is. Early increase in plasma of these

molecules might reflect an abrupt release of these proteins from necrotic neuroglial cells to the blood, revealing a profound white matter damage that occurs in ICH. Additionally, S100B has been previously found to be elevated in different body fluids in several conditions, including ischemic stroke.¹⁸⁻²¹ In this regard, it has been associated with infarct size, clinical outcome and neurovascular status on admission¹⁹. Nevertheless, in the case of brain ischemia, S100B protein does not reach the maximum concentration until day 2 or 3 after stroke onset²¹, whereas among ICH patients, S100B is rapidly increased in plasma within hours, as our group has formerly shown²². As a result of this delay, we may use S100B for distinguishing ischemic from hemorrhagic strokes at the very early moments after symptoms onset.

On the other hand, the transmembrane receptor RAGE is a multiligand member of the immunoglobulin superfamily, which plays a major role in both early development and progression of atherosclerosis and vascular inflammation^{23, 24}. RAGE has a C-truncated secretory isoform, named soluble RAGE (sRAGE), measurable in serum and plasma²⁵. Noticeably, S100B is a ligand for RAGE receptor, which transduces extracellular effects of S100B in astrocytes. Other responsive cells to S100 proteins through RAGE signaling are immune cells, activated endothelial cells, vascular smooth muscle cells and neurons²⁶. S100B is unique since it can engage RAGE in neurons at low and high concentrations with trophic and toxic effects respectively. Therefore, S100/RAGE interactions might have relevant consequences in inflammatory and hypoxia responses²⁶ and, because the neuroprotective properties of S100B at low concentrations²⁷, regulating the S100B/RAGE pathway might also have therapeutic implications. On the other hand, among patients with an acute stroke, low sRAGE level has been recently found to be associated with severe leukoaraiosis²⁸, a factor that, if extensive, is correlated with warfarin-related ICH after ischemic stroke²⁹.

In our study, the earlier the biomarkers are measured the more informative the model seems to be. Interestingly, models including biomarkers are significantly different from models without biomarkers when samples were obtained within 6 hours and even more, within

3 hours after symptoms onset (Figure 1.B-1.C). Based on our results, we hypothesize that a biomarker-based approach might aid in differentiating ischemic from hemorrhagic stroke, which seems strongly interesting to improve the early management of acute stroke patients. This strategy would be helpful, mainly in the pre-hospital setting, where initial assessment is usually offered by the ambulance and emergency service staff. Indeed, promptly identification of stroke subtype, that makes preplanning stroke care possible, has been already addressed using clinical algorithms such as those by Efsthathiou et al³⁰, who developed a clinical classification tool with a 97% positive and 99% negative predictive values for differentiating cerebral infarcts from ICH. Despite this test accuracy, it is noteworthy that ICHs were mixed with hemorrhagic infarcts in this study and moreover, clinical variables including biochemical and hematological analysis, were recorded within the first 24 hours and included into the model. Then, this approach seems not feasible for non-medical emergency personnel who usually evaluate the patient just after the stroke onset.

To ensure that our model was really useful in the pre-hospital setting, a logistic regression model and a CART algorithm including only biomarkers were also developed. It seems clear that a point-of-care device including only biomarkers would be relevant to be used by paramedical staff, since they are not supposed to perform an extensive clinical evaluation in the urgent setting. Then, we found accurate predictive models for those patients whose samples were collected within the 3 three hours (fig 3). Meanwhile, models including clinical and biomarker information could be more helpful when using later on, in the Emergency Department, where physicians are able to get clinical data not readily accessible in the first steps of the patient management.

On the other hand, such a diagnostic test would be valuable to improve the recruitment into therapeutic clinical trials, for instance those that use hemostatic factors for ICH. Indeed, a benefit from hemostatic therapy with recombinant activated factor VII was found in the subset of ICH patient that were treated within the first 2.5 hours after onset in the Factor Seven for Acute Hemorrhagic Stroke (FAST)³¹

Limitations of the study

Our study shows several limitations. Since we have performed a cross-sectional study, a causality relationship may not be claimed. For instance, we do not know if sRAGE level is pathologically elevated in ischemia or decreased in hemorrhage. Therefore, our results need to be validated in other cohorts across different settings, including temporal profiles and optimal cut-offs identification. If validations are positive, cost-effectiveness studies are guaranteed before clinical implementation is considered.

Strength of the study

Strength of our study is that the median time between stroke onset and sample collection for biomarker determination is only few hours and models showed a good performance within the first 3-6 hours after stroke onset, precisely when promptly differentiating an ischemic stroke from a brain hemorrhage seems promising. Furthermore, we have used two different and complementary approaches to test the association between biomarkers and stroke subtype. In our study, in addition to the logistic regression model, a classification tree was developed by CART method, resulted in a very intuitive algorithm which is useful in sorting patients into stroke subtypes (Figures 2-3). Interestingly, the CART method displayed similar results to the logistic regression analysis, identifying again S100B and sRAGE, with similar cut-off points, as the main factors related to stroke subtypes. Nevertheless, this algorithm needs to be upgraded, for instance including more biomarkers, and validated before it could be used as a reliable triage decision rule.

Conclusions

To sum up, a biochemical panel containing both S100B and sRAGE biomarkers as a rapid blood test might help to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke, especially within the first 6 and 3 hours after stroke onset. This approach would improve the management of both conditions, even in the pre-hospital setting, allowing a promptly beginning of the optimal treatment.

Acknowledgements

We thank the emergency department nurses, on-call neurologists, technicians of the core

laboratory and all participating stroke patients and their relatives by their continuous support to conduct studies on stroke biomarkers.

Funding Sources

This study was partially funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/322 & 08/361). Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network (RENEVAS, RD06/0026/0010) and the European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213). P.D. and A.R. are supported by Miguel Servet senior research contracts and M.M. by a predoctoral fellowship from the Carlos III Health Institute.

Disclosures

Dr Montaner has received honoraria for speaker's presentations and the Neurovascular Research Laboratory has received a research grant from Biosite Inc. No other authors report disclosures.

References

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121:e46-e215.
2. Rosamond WD, Folsom AR, Chambless LE, Wang CH, McGovern PG, Howard G, Copper LS, Shahar E. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) cohort. *Stroke*. 1999;30:736-743
3. Anderson CS, Huang Y, Arima H, Heeley E, Skulina C, Parsons MW, Peng B, Li Q, Su S, Tao QL, Li YC, Jiang JD, Tai LW, Zhang JL, Xu E, Cheng Y, Morgenstern LB, Chalmers J, Wang JG; INTERACT Investigators. Effects of early intensive blood pressure-lowering treatment on the growth of hematoma and perihematomal edema in acute intracerebral hemorrhage: the Intensive Blood Pressure Reduction in Acute Cerebral Haemorrhage Trial (INTERACT). *Stroke*. 2010;41:307-12.
4. Rasool AH, Rahman AR, Choudhury SR, Singh RB. Blood pressure in acute intracerebral haemorrhage. *J Hum Hypertens*. 2004;18:187-192.
5. Antihypertensive Treatment of Acute Cerebral Hemorrhage (ATACH) investigators. Antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage. *Crit Care Med*. 2010;38:637-48.
6. Oliveira-Filho J, Silva SC, Trabuco CC, Pedreira BB, Sousa EU, Bacellar A. Detrimental effect of blood pressure reduction in the first 24 h of acute stroke onset. *Neurology*. 2003; 61:1047-1051.
7. Vlcek M, Schillinger M, Lang W, Lalouschek W, Bur A, Hirschl MM. Association between course of blood pressure within the first 24 h and functional recovery after acute ischemic stroke. *Ann Emerg Med*. 2003; 42:619-626.
8. Aygun N, Masaryk TJ. Diagnostic imaging for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am*. 2002;13:313-334
9. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A, Quintana M, Palacios ME, Molina CA, Alvarez-Sabín J. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke*. 2008; 39:2280-2287.
10. Brott T, Bogousslavsky J. Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2000; 343:710-722.
11. Breiman L, Friedman J, Olshen R, et al. *Classification and Regression Trees*. Pacific Grove: Wadsworth, 1984.
12. Markey MK, Tourassi GD, Floyd CE Jr. Decision tree classification of proteins identified by mass spectrometry of blood serum samples from people with and without lung cancer. *Proteomics*. 2003;3:1678-1679
13. Garzotto M, Beer TM, Hudson RG, et al. Improved detection of prostate cancer using classification and regression tree analysis. *J Clin Oncol* 2005; 23:4322-4329.
14. Augustin S, Muntaner L, Altamirano JT, González A, Saperas E, Dot J, Abu-Suboh M, Armengol JR, Malagelada JR, Esteban R, Guardia J, Genescà J. Predicting Early Mortality After Acute Variceal Hemorrhage Based on Classification and Regression Tree Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7:1347-1354.

15. Muller R, Möckel M. Logistic regression and CART in the analysis of multimarker studies. *Clin Chim Acta.* 2008; 394:1-6.
16. Allard L, Lescuyer P, Burgess J, Leung KY, Ward M, Walter N, Burkhard PR, Corthals G, Hochstrasser DF, Sanchez JC. ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics.* 2004; 4:2242-2251.
17. Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, Raabe A, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Sitzer M. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77:181-184.
18. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care* 2007; 6:121-138.
19. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol.* 2005; 62:1130-1134
20. Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemela O, Hillborn M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma* 2004; 56:1229-1234.
21. Butter T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 1997; 28:1961-1955
22. Delgado P, Alvarez Sabin J, Santamarina E, Molina CA, Quintana M, Rosell A, Montaner J. Plasma S100B level after acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2006; 37:2837-2839
23. Yan SF, Naka Y, Hudson BI, Herold K, Yan SD, Ramasamy R, Schmidt AM. The ligand/SRAGEaxis: lighting the fuse and igniting vascular stress. *Curr Atheroscler Rep.* 2006; 8:232-239
24. Chang JS, Wendt T, Qu W, Kong L, Zou YS, Schmidt AM, Yan SF. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res.* 2008; 102:905-913
25. Park IH, Yeon SI, Ypun JH, Choi JE, Sasaki N, Choi IH, Shin JS. Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol.* 2004;40:1203-1211
26. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* 2007; 7:711-724.
27. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1450:191-231.
28. Yokota C, Minematsu K, Tomii Y, Naganuma M, Ito A, Nagasawa H, Yamaguchi T. Low levels of plasma soluble receptor for advanced glycation end products are associated with severe leukoaraiosis in acute stroke patients. *J Neurol Sci.* 2009; 287:41-44
29. Smith EE, Rosand J, Knudsen BA, Hyleck EM, Greenberg SM. Leukoaraiosis is associated with warfarin-related hemorrhage following ischemic stroke *Neurology.* 2002; 59:193-197
30. Efstathiou SP, Tsioulos DI, Zacharos ID, Tsiakou AG, Mitromaras AG, Mastorantonakis SE, Pefanis AV, Mountokalakis TD. A new classification tool for clinical differentiation between haemorrhagic and ischaemic stroke. *J Intern Med.* 2002; 252:121-129.
31. Mayer SA, Davis SM, Skolnick BE, Brun NC, Begtrup K, Broderick JP, Diringer MN, Steiner T; FAST trial investigators. Can a subset of intracerebral hemorrhage patients benefit from hemostatic therapy with recombinant activated factor VII? *Stroke.* 2009;40:833-40.

Table 1. Baseline demographic characteristics and risk factors profile in our study population.

Variable	All patients n=915	Ischemic n=776	Hemorrhagic n=139	p-value
Gender (male), n (%)	471 (51.5)	385 (49.7)	58 (41.7)	0.084
Age, mean \pm SD	72.63 \pm 12.464	73.05 (12.5)	70.35 (12)	0.019*
Previous hemorrhagic stroke, n (%)	14 (1.5)	6 (0.8)	8 (6.1)	<0.001*
Previous ischemic stroke, n (%)	200 (23)	174 (23.6)	26 (20)	0.372
Hypertension, n (%)	483 (57.6)	410 (57.7)	73 (57)	0.894
Diabetes, n (%)	222 (26.5)	193 (27.1)	29 (22.7)	0.289
Current Smoker, n (%)	128 (15.3)	108 (15.2)	20 (15.6)	0.905
Alcohol intake, n (%)	48 (5.7)	35 (4.9)	13 (10.2)	0.019*
Dyslipidemia, n (%)	195 (23.2)	177 (24.9)	18 (14.1)	0.008*
Previous peripheral arteriopathy, n (%)	70 (8.3)	66 (9.3)	4 (3.1)	0.02*
Previous coronary disease, n (%)	114 (13.6)	110 (15.5)	4 (3.1)	<0.001*
Previous atrial fibrillation, n (%)	199 (23.7)	184 (25.9)	15 (11.7)	0.001*
Other previous embolic cardiopathy, n (%)	47 (5.6)	41 (5.8)	6 (4.7)	0.625
NIHSS (admission) median (interquartile range)	6 (2-14)	6 (2-13)	11 (6-16)	<0.001*

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; * p-value<0.05

Table 2. Biochemical profile regarding stroke subtype and blood sample collecting timing.

	All patients, blood sample <24 hours n= 915			blood sample < 6 hours n=337			blood sample < 3 hours n=166		
	Ischemic stroke n= 776	Hemorrhagic stroke n= 139	p-value	Ischemic stroke n=279	Hemorrhagic stroke n=58	p-value	Ischemic stroke n=132	Hemorrhagic stroke n=34	p-value
Caspase-3	2.15 (0.95-5.06)	2.11 (1.13-4.35)	0.891	2.62 (1.11-5.29)	2.19 (1.27-3.62)	0.269	2.69 (1.18-5.16)	2.18 (1.27-4.38)	0.586
NT-3	0 (0-0.68)	0.7 (0-1.1)	0.284	0 (0.04-0.79)	0 (0-0.59)	0.615	0.13 (0-0.9)	0.15 (0-0.55)	0.381
BNP	69.59 (21.79-163.61)	55.45 (21.42-129.60)	0.164	79.81 (22.23-191.03)	51.26 (22.16-115.06)	0.076	91.59 (20.59-212.22)	55.45 (23.18-109.08)	0.071
CRP	10.46 (4.59-25.68)	10.49 (4.07-28.43)	0.863	10.63 (4.34-28.77)	9.02 (4.41-22.82)	0.541	9.86 (4.54-27.26)	9.25 (5.04-19.86)	0.921
Chimerin II	0 (0-0.8)	0 (0-1.21)	0.172	0 (0-0.66)	0 (0-0.6)	0.683	0 (0-0.66)	0 (0-0.56)	0.699
D-dimer	0.8 (0.36-1.87)	0.87 (0.35-3.33)	0.097	0.9 (0.34-1.94)	0.76 (0.33-2.15)	0.867	0.91 (0.34-1.72)	0.74 (0.42-1.81)	0.679
MMP-9	255.54 (147.03-459.83)	303.50 (174.89-521)	0.024*	277.07 (169.49-454.37)	329.58 (169.37-503.25)	0.337	267.41 (145.48-451.39)	342.34 (222.33-574.39)	0.093
RAGE	0.91 (0.58-1.45)	0.78 (0.51-1.36)	0.09	1.02 (0.67-1.54)	0.77 (0.54-1.06)	0.009*	1.1 (0.69-1.71)	0.77 (0.57-0.96)	0.031*
S100B	58.43 (30.98-119.99)	109.63 (54.38-241.99)	<0.001*	58.7 (29.43-117.54)	107.58 (56.69-243.78)	<0.001*	60.1 (29.63-123.28)	107.47 (60.29-212.66)	0.006*
Secretagogin	0.15 (0.07-0.31)	0.16 (0.05-0.39)	0.899	0.14 (0.06-0.27)	0.14 (0-0.26)	0.524	0.16 (0.06-0.27)	0.15 (0-0.25)	0.64
Cerebellin	23.94 (17.78-30.58)	23.2 (17.56-30.12)	0.733	23.33 (17.46-30.47)	26.56 (17.55-32)	0.37	24.56 (18.5-31.15)	24.4 (16.79-32.3)	0.649
NPY	298.35 (184.61-560.23)	319.31 (144.23-601.35)	0.684	305.91 (166.19-489.59)	296.26 (197.21-413.11)	0.923	293.1 (201.33-447.98)	318.65 (197.21-413.11)	0.918

Biomarker values are expressed by median (interquartile range); * p-value<0.05. Caspase 3, chimerin II, cerebellin, MMP-9, NT-3, RAGE, secretagogin are expressed as ng/mL; BNP, S100B, NPY are expressed as pg/mL; CRP and D-dimer are expressed as µg/mL.

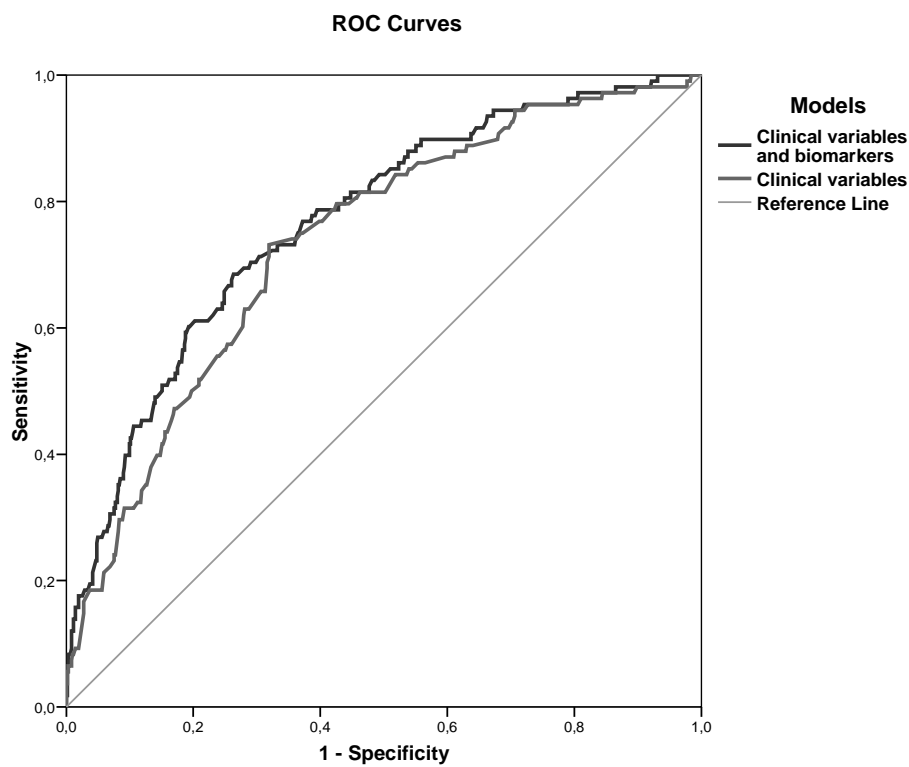
Table 3. Independent predictors for hemorrhagic stroke resulting from the logistic regression models depending on the collecting sample timing.

Variables	Blood sample <24 hours		Blood sample <6h		Blood sample <3h	
	OR (CI 95%)	P-value	OR (CI 95%)	P-value	OR (CI 95%)	P-value
Age	-----		0.97 (0.94-0.99)	0.01	0.95 (0.92-0.99)	0.01
Gender (male)	0.62 (0.38-0.99)	0.046	0.39 (0.17-0.89)	0.025	-----	
Previous Hemorrhagic stroke	4.72 (1.28-17.39)	0.02	-----		-----	
Coronary Disease	0.32 (0.11-0.92)	0.034	0.16 (0.02-1.21)	0.076	-----	
Atrial fibrillation	0.41 (0.21-0.79)	0.008	-----		-----	
Dyslipemia	0.42 (0.22-0.81)	0.01	-----		-----	
NIHSS score	1.08 (1.05-1.12)	<0.001	1.1 (1.04-1.16)	0.001	-----	
S100B (pg/mL)	2.89 (1.8-4.65)	<0.001	3.97 (1.82-8.68)	0.001	5.02 (1.88-13.42)	0.001
RAGE(ng/mL)	0.46 (0.29-0.74)	0.001	0.22 (0.10-0.52)	<0.001	0.11 (0.03-0.36)	<0.001

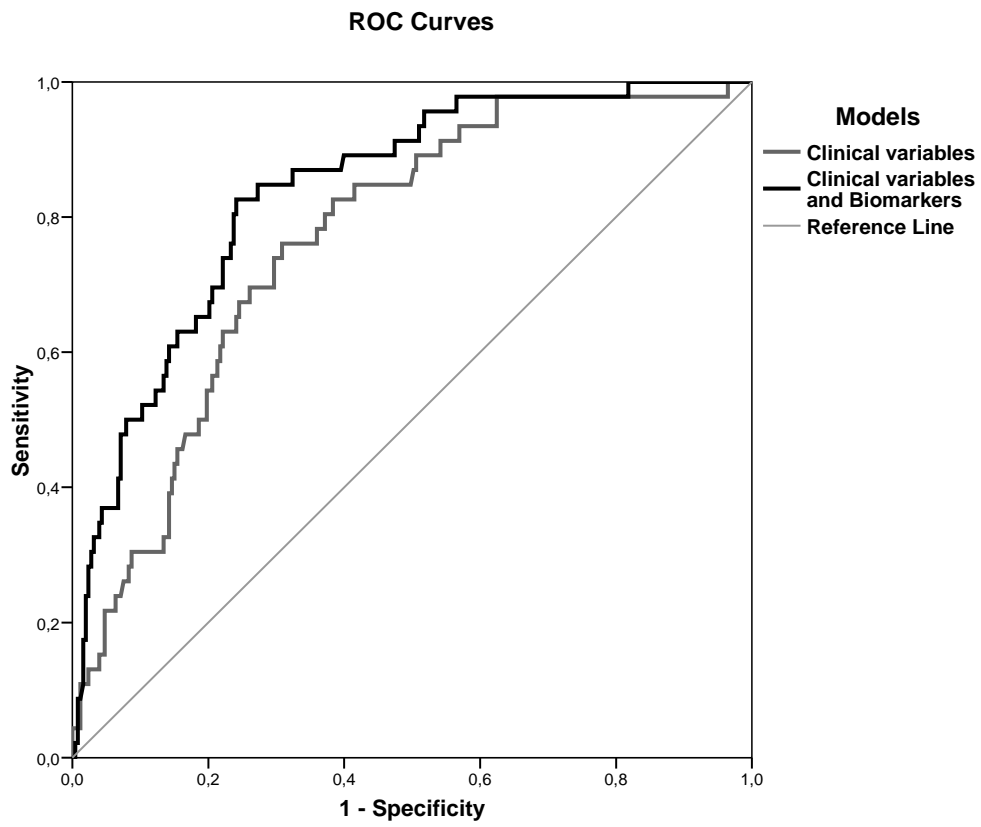
NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

Figure 1. ROC curves of the predicted probabilities of the logistic regression models depending on the collecting sample timing. The ROC curves show how the biomarkers improve the predictive ability of the clinical variables in differentiating ischemic from hemorrhagic strokes, mainly when these proteins are measured within the first three hours after stroke onset.

A: Blood Samples <24 hours



B: Blood Samples <6 hours



C: Blood Samples <3 hours

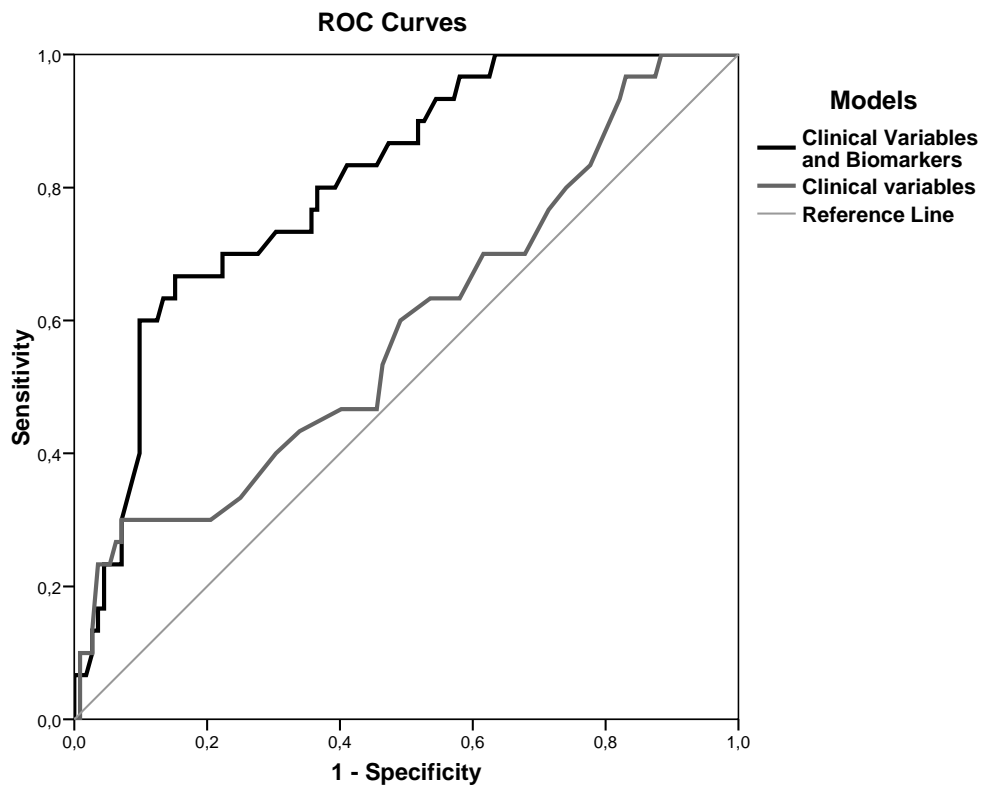


Figure 2. Classification model for hemorrhagic and ischemic strokes based on an inductive tree generated by CART analysis in the set of patients with blood samples obtained within the first 6 hours after symptoms onset, when clinical variables and biomarkers were considered.

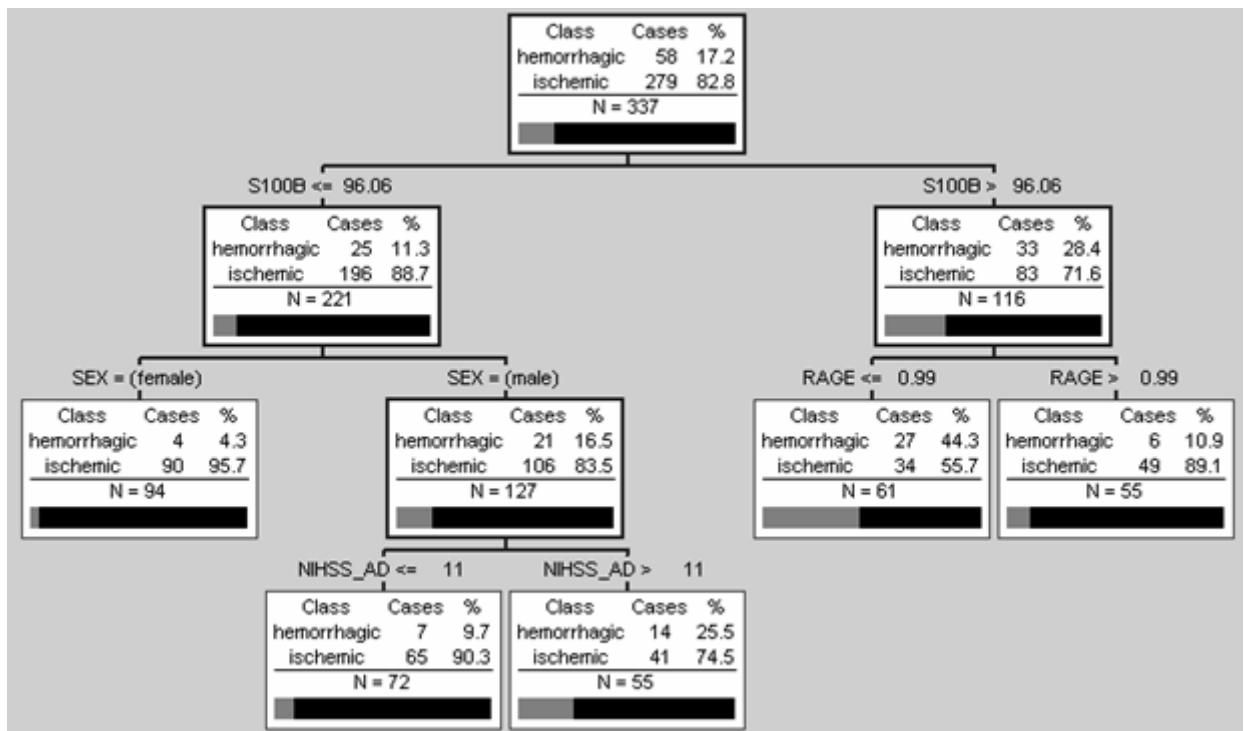
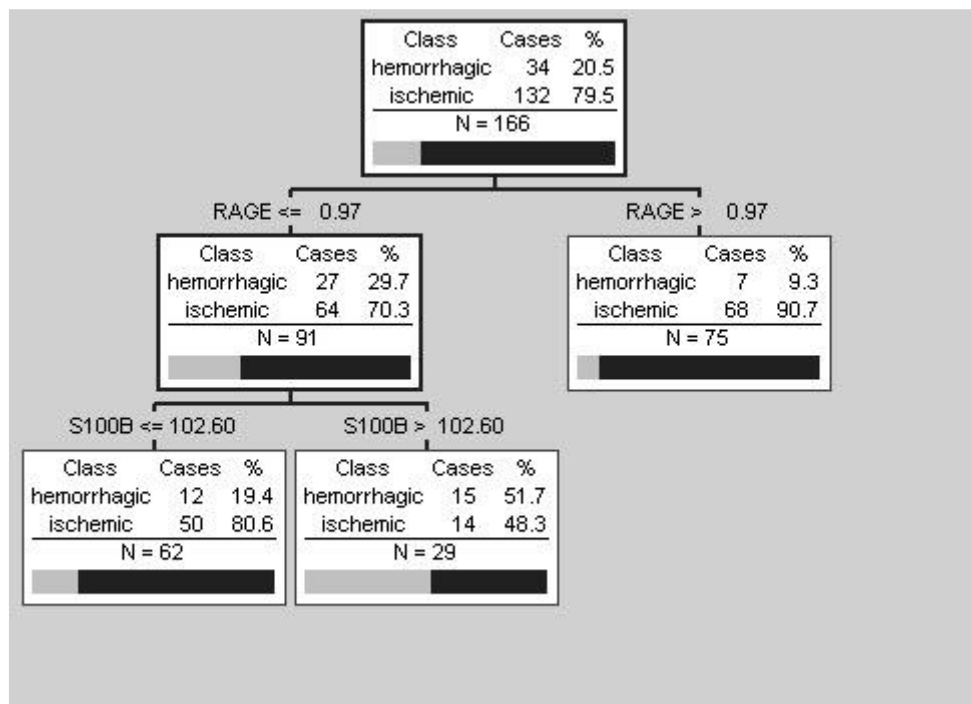


Figure 3. Classification model for hemorrhagic and ischemic strokes based on an inductive tree generated by CART analysis in the set of patients with blood samples obtained within the first 3 hours after symptoms onset, when only biomarkers were considered.



3.4 LOWER CONCENTRATIONS OF THROMBIN-ANTITHROMBIN COMPLEX (TAT) CORRELATE TO HIGHER RECANALISATION RATES AMONG ISCHAEMIC STROKE PATIENTS TREATED WITH T-PA. Thromb Haemost. 2009;102:759-64.

Cardiovascular Biology and Cell Signalling

Lower concentrations of thrombin-antithrombin complex (TAT) correlate to higher recanalisation rates among ischaemic stroke patients treated with t-PA

Israel Fernandez-Cadenas; Maite Mendioroz; Josep Munuera; José Alvarez-Sabin; Alex Rovira; Adoracion Quiroga; Natalia Corbeto; Marta Rubiera; Pilar Delgado; Anna Rosell; Marc Ribó; Carlos A. Molina; Joan Montaner

Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Neurology Service, Departamento de medicina, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Summary

An elevated concentration of the thrombin-antithrombin complex (TAT) has been associated with high mortality rates and poor outcome in ischaemic stroke patients treated with tissue plasminogen activator (t-PA). Moreover, antithrombin drugs have been tested in combination with t-PA in the acute phase of ischaemic stroke to increase treatment efficacy. We aimed to study whether poor outcome associated with TAT among ischaemic stroke patients treated with t-PA could be due to the effects of this complex on recanalisation rates of the middle cerebral artery (MCA) and on haemorrhagic transformation. The TAT levels of 89 patients having a proximal MCA occlusion were measured by ELISA, and the patients were then treated with t-PA. Complete recanalisation was diagnosed by transcranial Doppler (TCD) at 1, 2 and 6 hours post-t-PA infusion and haem-

orrhagic transformation was identified by computed tomography (CT). Lower levels of TAT were associated with better recanalisation rates at all time-points (1 hour: OR = 24.8 95% CI 1.4–434.8, $p = 0.028$; 2 hours: OR = 6.3 95% CI 1.5–27, $p = 0.014$; 6 hours: OR = 6.4 95% CI 1.5–26.5, $p = 0.011$) after adjustment for stroke risk factors. However, no correlation was found between TAT concentration and haemorrhagic transformation. The elevated mortality rates previously observed in patients with high levels of TAT might have been due to revascularisation resistance. Low levels of TAT are not associated with an increase in haemorrhagic complications after t-PA, indicating that the combination of thrombin blockers and t-PA could be a safe and effective treatment for ischaemic stroke in the future.

Keywords

t-PA, thrombolysis, thrombin, Argatroban, plasmin

Thromb Haemost 2009; 102: 759–764

Introduction

The benefits of fibrinolytic (thrombolytic) therapy with tissue plasminogen activator (t-PA) for ischaemic stroke patients (1) have been partially limited due to a lack of blood flow restoration, in many occluded patients, and to the risk of symptomatic haemorrhagic transformation, in approximately 1.7 to 7% of cases (2). Low rates of recanalisation are associated with greater cerebral ischaemic lesions, and thus, with poor neurological outcome (3, 4). Therefore, major efforts are being made to identify biological or genetic biomarkers that could predict the response of an individual patient to fibrinolytic treatment (5–11).

The serine protease thrombin is an essential component of the coagulation cascade, executing multiple functions such as cleavage of fibrinogen to fibrin and activation of platelets, which are implicated in physiological and pathological clotting (12). Furthermore, thrombin activates Factor XIII, which stabilises fibrin and clots, and it activates Protein C, which slows down clot formation, thereby regulating coagulation by a different pathway. Several coagulation factors that affect thrombin activity (e.g. FXI and FXII) have been associated with ischaemic stroke (13–15).

Nevertheless, the relationship between thrombin levels and ischaemic strokes is not clear: an elevated level of thrombin

Correspondence:
Dr. Joan Montaner
Neurovascular Research Laboratory
Neurovascular Unit,
Institut de Recerca
Hospital Vall d'Hebron
Pg Vall d'Hebron 119–129
08035 Barcelona, Spain
Tel.: +34934894073, Fax: +34934894015
E-mail: 31862jmv@comb.es

Financial support:
This study was supported by the Spanish government (grant FIS 06/0586), Fundación Mutua Madrileña 2006, Fundación Ramon Areces 2007, and the Spanish stroke research network RENEVAS.

Received: June 22, 2008
Accepted after major revision: July 2, 2009

Prepublished online: August 27, 2009
doi:10.1160/TH08-06-0398

could be either a risk factor for or a consequence of these events. Endogenous fibrinolysis and coagulation might modulate physiological responses to t-PA. Indeed, the proteins plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), both inhibitors of fibrinolysis, influence recanalisation rates (6, 16). Thus, we hypothesised that other regulation factors of the coagulation-fibrinolytic pathways, such as thrombin, might also be associated with recanalisation rates.

Tanne et al. measured levels of thrombin-antithrombin (TAT) complex in ischaemic stroke patients at 24 hours post-tPA treatment and, based on the results, were able to predict mortality at 3 months (17). However, the biological mechanism behind this correlation remains unknown. In these patients low recanalisation rates have also been associated with mortality at 3 months post-treatment (18).

In this study we aimed to explore firstly whether pre-treatment plasma levels of TAT in stroke patients treated with t-PA correlated to low recanalisation rates, and secondly, if such a correlation were to be found, whether it could explain the relationship between TAT levels and mortality reported for this patient group.

Methods

Study population

Eighty-nine patients with an acute ischaemic stroke admitted at the emergency department of a University Hospital were prospectively studied. Our target group consisted of patients who had had an acute ischaemic stroke admitted within the first 3 hours after symptoms onset. Consecutive patients with a non-lacunar stroke involving the vascular territory of the middle cerebral artery (MCA) were evaluated. Patients who had a documented proximal MCA occlusion on transcranial Doppler (TCD) and received t-PA in a standard 0.9mg/kg dose (10% bolus, 90% continuous infusion during 1 hour) were included in the study.

Clinical and transcranial Doppler protocol

A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify potential mechanisms of cerebral infarction, a set of diagnostic tests was performed including electrocardiogram, chest radiography, carotid ultrasonography, complete blood count and leukocyte differential and blood biochemistry in all patients; when indicated some patients also underwent special coagulation tests, transthoracic ecocardiography and Holter monitoring. With this information, and the neuroimaging data, previously defined etiologic subgroups were determined (19).

Clinical examination was performed on admission and at 1 and 2 hours post-tPA administration and again at 12, 24 and 48 hours after symptoms onset. Stroke severity as well as improvement, stability or neurological worsening were assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) (20). Improvement, stability or neurological worsening were measured at 48 hours post symptoms onset and mortality was measured at three months.

A standard TCD examination was performed by experienced neurologists in the emergency room on admission, before t-PA

administration, using I-channel 2MHz equipment (TCD 100M, Spencer Technologies, Seattle, Washington, USA). A standard set of diagnostic criteria was applied to diagnose arterial occlusion. Proximal MCA occlusions were defined as the absence of flow or the presence of minimal flow signal throughout the MCA at an insonation depth between 45 to 65mm, accompanied by flow diversion in the ipsilateral anterior cerebral artery and posterior cerebral artery, according to the Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) gradient system (21). To assess recanalisation, follow up recordings were performed at 1 hour after t-PA administration and again at 2 hours and 6 hours. After the site of MCA occlusion was identified, continuous monitoring of the residual flow signals was performed with a Marc 600 head frame (Spencer Technologies) or DWL metal head frame to maintain tight transducer fixation and a constant angle of insonation. Changes on TCD for each patient were determined by a rater using direct visual control of monitoring display.

Complete recanalisation on TCD was diagnosed if the end-diastolic flow velocity improved to normal or elevated values (normal or stenotic signals) in previously demonstrated absent or minimal flow (22).

Intravenous heparin was not administered during the study period. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and all patients or their relatives gave informed consent.

Neuroimaging protocol: CT and MRI

On admission, all patients underwent a Computed Tomography (CT) or Magnetic Resonance (MRI) within the first 3 hours of stroke onset as previously described (23). A CT scan was repeated after 24–48 hours or earlier when rapid neurological deterioration occurred. The presence and type of haemorrhagic transformation were defined according to previously published criteria (24).

To determine thrombus area, MRI examinations were performed at 48 hours post symptoms onset with 1.5T whole-body imagers (Magnetom Vision Plus or Symphony Siemens Medical Systems, Erla) with 24mT/m gradient strength, 300µsec rise time, and an echo-planar-capable receiver equipped with a gradient overdrive. The following images were obtained: a) transverse T2-weighted susceptibility-based echo-planar gradient-echo images (0.8/29 [repetition time msec/echo time msec], one signal acquired, total acquisition time of 2.8 seconds) or b) transverse DW echo-planar spin-echo images (4,000/100, two signals acquired, total acquisition time of 56 seconds). The susceptibility sign on MRI images was defined as presence of hypointensity within the ICA or MCA, in which the diameter of the hypointense signal within the vessel exceeded the contralateral vessel diameter. The magnetic susceptibility produces a non-uniform magnetic field and fast dephasing of spins. This phenomenon is more important in T2 weighted images. The greater (length) and smaller (thickness) diameters of the hyposignal in axial plane were measured (millimeters) (25–28). Thrombus area was calculated as an ellipse: length X thickness X π .

Determination of TAT complex levels

Blood samples were obtained from patients before t-PA infusion (baseline) and stored at -80°C . Plasma samples were obtained using citrate tubes, and TAT levels, which are commonly ac-

Table 1: Demographic data and risk factors for complete recanalisation of ischaemic stroke patients at three different time-points after t-PA infusion. Rec.: complete recanalisation; HT: hypertension; AF: atrial fibrillation; TAT: thrombin-antithrombin complex.

	Rec 1h	p-Value	Rec 2h	p-Value	Rec 6h	p-Value
	YES (9)NON (73)		YES (18) NON (56)		YES (22) NON (43)	
Men n (%)	8 (88.9) 36 (49.3)	<0.05	13 (72.2) 26 (46.4)	0.065	17 (77.3) 15 (34.9)	<0.05
Women n (%)	1 (11.1) 37 (50.7)		5 (27.8) 30 (53.6)		5 (22.7) 28 (65.1)	
Current smokers n (%)	2 (25) 16 (23.9)	0.94	2 (11.8) 15 (30)	0.14	4 (20) 9 (23.1)	0.79
Non-smokers n (%)	6 (75) 51 (76.1)		15 (88.2) 35 (70)		16 (80) 30 (76.9)	
Hypertension n (%)	2 (22.2) 41 (56.2)	0.054	6 (33.2) 33 (58.9)	0.1	8 (36.4) 25 (58.1)	0.12
Non-Hypertension n (%)	7 (77.8) 32 (43.8)		12 (66.7) 23 (41.1)		14 (63.6) 18 (41.9)	
Diabetes mellitus n (%)	2 (22.2) 13 (17.8)	0.74	3 (16.7) 11 (19.6)	0.78	3 (13.6) 8 (18.6)	0.74
Non-Diabetes mellitus n (%)	7 (77.8) 60 (82.2)		15 (83.3) 45 (80.4)		19 (86.4) 35 (81.4)	
AF n (%)	4 (44.4) 30 (41.1)	0.84	9 (50) 22 (39.3)	0.58	10 (45.5) 18 (41.9)	0.8
Non-AF n (%)	5 (55.6) 43 (58.9)		9 (50) 34 (60.7)		12 (54.5) 25 (58.1)	
Dyslipemia n (%)	3 (33.3) 28 (38.9)	0.75	8 (44.4) 19 (34.5)	0.58	10 (45.5) 15 (35.7)	0.59
Non-Dyslipemia n (%)	6 (66.7) 44 (61.1)		10 (55.6) 36 (65.5)		12 (54.5) 27 (64.3)	
Previous stroke n (%)	1 (11.1) 11 (15.1)	0.75	1 (5.6) 9 (16.1)	0.43	2 (9.1) 6 (14)	0.71
Non-Previous stroke n (%)	8 (88.9) 62 (84.9)		17 (94.4) 47 (83.9)		20 (90.9) 37 (86)	
Etiology: n (%)						
cardioembolic	4 (44.9) 32 (45.1)	0.99	9 (50) 23 (42.6)	0.82	11 (50) 20 (47.6)	0.98
atherothrombotic	3 (33.3) 22 (31)	0.99	5 (27.8) 19 (35.2)	0.82	7 (31.8) 14 (33.3)	0.98
undetermined	2 (22.2) 17 (23.9)	0.99	4 (22.2) 12 (22.2)	0.82	4 (18.2) 8 (19)	0.98
baseline NIHSS n (median)	9 (17) 55 (18)	0.5	17 (17) 47 (18)	0.35	21 (17) 43 (18)	0.112
TAT n (µg/L)	9 (16.94) 73 (36.26)	<0.05	18(21.65) 56 (37.53)	<0.05	22 (23.39) 43 (37)	<0.05

cepted as a direct measure of thrombin levels, were quantified using a commercially available ELISA kit (Enzygnost TAT micro, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) following the manufacturer's guidelines. The measurements were performed in duplicate and the detection range was 2 to 60µg/L.

Statistical analysis

Descriptive and frequency statistical analyses were performed and comparisons were made using the SPSS statistics package, version 12.0. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 test or Fisher's exact test for categorical variables. When indicated, Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were used. Spearman correlation was used to determine if TAT levels were related to thrombus area. To calculate the sensitivity and specificity for TAT values and predict complete recanalisation, a receiver operating characteristic (ROC) curve was configured. A logistic regression analysis was performed to determine factors that could be considered independent predictors of MCA recanalisation. We took into account recanalisation rates at different time points after t-PA infusion. Univariate analysis was performed using the variables previously associated with recanalisation in other studies. The statistically significant variables were included in the multivariable analysis. Other risk factors for stroke were also included in the logistic regression.

Sample size estimations were determined using Ene software. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

We included in the study 85 patients (45.9% women) with an acute ischaemic stroke involving the MCA territory. Mean age was 72.4 years (ranging from 45 to 91 years). A total of 52.9% of patients were hypertensive, 38.6% were dyslipaemic and 17.6% had a history of diabetes mellitus. Median NIHSS score of the series on admission was 18 (range 4 to 28). Successful complete recanalisation occurred in 11% (n=9) of patients at 1 hour, 24.3% (n=18) at 2 hours and 33.8% (n=22) at 6 hours post-tPA administration. Main baseline characteristics of patients regarding the presence of an effective complete recanalisation following t-PA infusion are shown in Table 1. Among them only sex, presence of hypertension at baseline or TAT levels were associated with revascularisation rates.

TAT intra-assay variability was 4.24% and the inter-assay difference was 1.9%. No association was found between TAT and the different demographic and risk factors including sex, stroke etiology or presence of hypertension at baseline (data not shown). TAT was associated with complete recanalisation at every time point (Complete recanalisation: 16.9µg/L, Non-complete recanalisation: 36.3µg/L, at 1 hour post-t-PA, 95% CI 4.75–33.9µg/L, p=0.048; Complete recanalisation: 21.7µg/L, Non-complete recanalisation: 37.5µg/L at 2 hours post-t-PA, 95% CI 2.58–29.9µg/L, p=0.024; Complete recanalisation: 23.4µg/L, Non-complete recanalisation: 37µg/L at 6 hours post-t-PA, 95% CI 1–26.76µg/L, p=0.043). A cut point of 24µg/L ob-

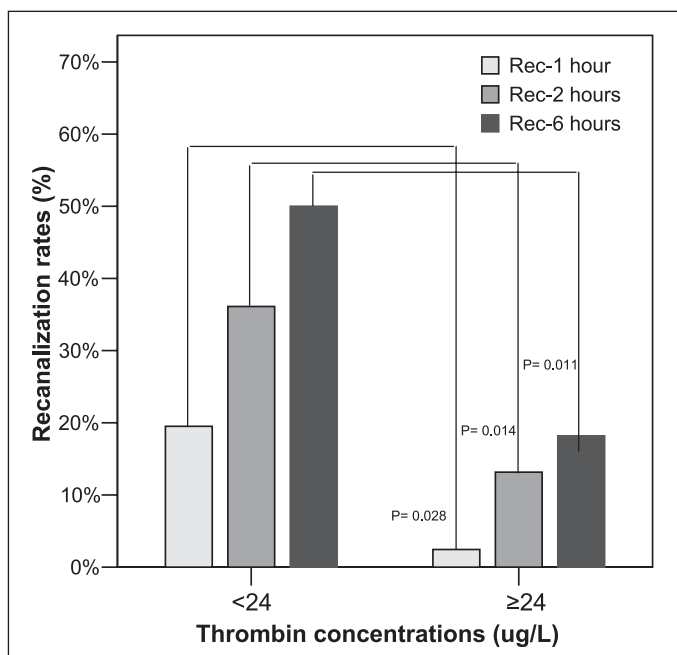


Figure 1: Correlation between pre-treatment plasma thrombin-antithrombin complex (TAT) levels (µg/L) and complete recanalisation rates at different time-points after t-PA infusion.

Rec.: complete recanalisation. Patients with < 24µg/L baseline TAT presented better revascularisation rates by the end of t-PA infusion: 19.5% (n=8), as compared with those with > 24µg/L TAT: 2.4% (n=1), OR=8 95% CI 1–61.1, p=0.013. Recanalisation at 2h (< 24µg/L TAT: 36.1% [n=13], > 24µg/L TAT: 13.2% [n=5], OR=2.7 95% CI 1.1–6.9, p=0.03). Recanalisation 6 hours after thrombolysis (< 24µg/L TAT: 50% [n=16], > 24µg/L TAT: 18.2% [n=6], OR=2.7 95% CI 1.2–6.1, p=0.009).

tained from the ROC curves (53% sensitivity, 89% specificity) showed the best association with complete recanalisation (see Supplementary Figure 2 online at www.thrombosis-online.de). Patients with <24µg/L baseline TAT presented better revascularisation rates by the end of tPA infusion: 19.5% (n=8), as compared with those with >24 µg/L TAT: 2.4% (n=1), OR=8 95% CI 1–61.1, p=0.013. Similar results were found for complete recanalisation at 2h (<24µg/L TAT: 36.1% [n=13] of these patients present complete recanalisation, > 24µg/L TAT: 13.2% [n=5] of these patients present complete recanalisation, OR=2.7 95% CI 1.1–6.9, p=0.03) and at 6 hours after thrombolysis (<24µg/L TAT: 50% [n=16] of these patients present complete recanalisation,

>24µg/L TAT: 18.2% (n=6) of these patients present complete recanalisation, OR=2.7 95% CI 1.2–6.1, p=0.009. [Figure 1])

No association was found between TAT concentration and haemorrhagic transformation (Parenchymal Haematoma type-2 [n=2]: 30.7µg/L, 95% CI 33.9–95.4µg/L, Parenchymal Haematoma type-1 [n=6]: 15.9µg/L, 95% CI 2.81–28.96µg/L, Haemorrhagic Infarct type-2 [n=8]: 44.2µg/L, 95% CI 11.31–77.06µg/L, Haemorrhagic Infarct type-1 [n=9]: 48.4µg/L, 95% CI 23.28–73.56µg/L, Non-haemorrhagic transformation [n=54]: 32.5µg/L, 95% CI 24.77–40.3µg/L, p=0.23).

TAT concentration was not associated with mortality (mortality after t-PA [n=16]: 39.2µg/L, versus no mortality after t-PA [n=69]: 32.8µg/L, p=0.61) nor neurological improvement (improvement [n=47]: 34.6µg/L, stability [n=28]: 31µg/L, worsening [n=9]: 43.5µg/L, p=0.68).

No correlation was found between TAT and area, length or thickness of the thrombus (p=0.76, p=0.65, and p=0.74 respectively) in a subgroup of 19 patients in whom measurement of the thrombus could be obtained.

After logistic regression adjusted for male sex, stroke risk factors (age, hypertension, smoking, diabetes mellitus), baseline NIHSS and stroke etiology, TAT level was independently associated with complete MCA recanalisation at different time points (Complete recanalisation at 1 hour: OR=24.8 95% CI 1.4–434.8, p=0.028, for TAT < 24µg/L). Similar results were found for complete recanalisation at 2h and 6h (Table 2). In contrast logistic regression with TAT as a continuous variable did not reveal a significant association after logistic regression, although there was a trend detected (OR=0.97 95% CI 0.93–1, p=0.095).

Discussion

In this study, we report that levels of pre-treatment plasma levels of TAT complex in ischaemic stroke patients correlate with the efficacy of t-PA treatment (gauged as complete recanalisation of the occluded artery). Moreover, we found that low TAT complex levels are not associated with the type of haemorrhagic transformation.

A previous study of ischaemic stroke patients from the NINDS group found an association between TAT levels (measured 24 hours after t-PA infusion) and mortality at 3 months (18). The authors reported that a high level of TAT is a predictive factor for mortality after fibrinolytic therapy but did not explain the clinical basis of this association. In another study

Table 2: Odds ratio for pre-treatment plasma thrombin-antithrombin complex (TAT) levels after logistic regression and univariate analysis before logistic regression. 24µg/L was the cut-off of TAT. The covariates of the multivariable model were: male sex, stroke risk factors (age, hypertension, smoking and diabetes mellitus), baseline NIHSS and stroke etiology.

	Rec 1h YES	OR (95% CI)	p-Value	Rec 2h YES	OR (95% CI)	p-Value	Rec 6h YES	OR (95% CI)	p-Value
TAT<24 µg/L n (%) Logistic regression	8 (19.5%)	24.8 (1.4–434.8)	<0.05	13 (36.1%)	6.3 (1.5–27)	<0.05	16 (50%)	6.4(1.5–26.5)	<0.05
TAT<24 µg/L n (%) Univariate	8 (19.5%)	8 (1–61.1)	<0.05	13 (36.1%)	2.7 (1.1–6.9)	<0.05	16 (50%)	2.7 (1.2–6.1)	<0.05

(29–31), whose results are consistent with ours, high levels of TAT predicted poor clinical outcome and unsuccessful reperfusion in patients with acute myocardial infarction; however, in this study the TAT levels were measured after t-PA, whereas in our study they were measured at baseline, before fibrinolytic administration.

Thrombin is the main enhancer of the coagulation cascade; accordingly it seems reasonable that patients with low levels of TAT present a higher chance to recanalise than patients with high level of TAT. As such, the high mortality rates of patients with elevated levels of TAT described by Tanne *et al.* could have been due to resistance to recanalisation. Nevertheless, in our group of patients, there was no statistically significant correlation between pre-fibrinolytic therapy levels of TAT and mortality rates. This result could be explained by two factors. Firstly, we measured TAT before t-PA infusion, whereas Tanne *et al.* measured TAT at 24 hours post-tPA. Indeed, thrombin activation and regulation might change after t-PA administration. Moreover, TAT levels could also be associated with mortality, if they were measured after 24 hours of t-PA infusion. Secondly, we studied only 89 patients, whereas Tanne *et al.* studied 465 patients. Therefore, our sample size is not powerful enough for other endpoints (e.g. mortality). Indeed, considering the levels of TAT that we obtained, and assuming a p-value of 0.05 and a power of 80, the total number of patients needed to find an association between TAT levels and mortality would be 660 (330 patients who died after t-PA + 330 patients who survived after t-PA), as calculated with the Ene software. Given our sample size, it would have been very difficult to observe a statistically significant correlation. However, we did find that patients with levels of TAT > 24 µg/L had nearly twice the mortality rate as did those with levels < 24 µg/L (23.3% vs. 14.3%, respectively). This suggests that with a larger patient population, we might have been able to observe such an association between baseline TAT levels and mortality rates.

However, despite the small sample size, we did observe significant differences when using recanalisation as a surrogate marker for treatment outcome.

We also did not observe any correlation between TAT levels and the area, length or thickness of the thrombus (as measured on MRI). This could be due to the small number of patients in whom thrombus could be measured (n=19). Alternatively, since the measurements made based on the MRI images are only an approximation of the *in vivo* dimensions of the thrombi, they might not have been accurate enough to reflect statistical significance.

Our study is limited by the fact that we did not have angiographic data for the patients, which might have provided us with more information on the mechanisms of thrombin activation and its role in t-PA treatment of ischaemic stroke patients. Furthermore, we used an ROC curve to calculate a cutoff value of TAT concentration (24 µg/L) for predicting recanalisation, instead of establishing a cut-off before having begun the study, which might have been better in terms of statistical methodology.

The association of TAT with complete recanalisation of the artery in ischaemic stroke patients treated with t-PA is further supported by the fact that thrombin blockers are potentially use-

What is known about this topic?

- The association of TAT with mortality after t-PA.

What does this paper add?

- This association is caused by the effects of TAT over recanalisation.

ful new drugs in the treatment of ischaemic stroke. Thrombin blockers bind selectively to the catalytic site of thrombin, acting as a competitive inhibitor. Argatroban is a thrombin inhibitor that has been shown to reduce thrombus formation and ischaemia in animal models of microvascular thrombosis and of embolic stroke (32, 33). It is currently approved for treatment of acute ischaemic stroke in Japan, but not in Europe or the USA. Administration of Argatroban within 48 hours of stroke has been shown to improve overall patient outcome without increasing intracranial haemorrhage (34, 35). Moreover, LaMonte *et al.* (36) evaluated the safety of Argatroban in 171 acute stroke patients in the first ever study of this drug in North America, showing that symptomatic intracranial haemorrhage and 90-day mortality did not differ significantly between treated and non-treated patients.

Our observation that lower endogenous levels of TAT correlate with better recanalisation rates is consistent with the findings of LaMonte *et al.* (36) and suggests that inhibition of thrombin in conjunction with t-PA administration could prove effective for treatment of patients with acute ischaemic stroke. Nevertheless, well-controlled clinical trials are required to prove this hypothesis.

Study limitations

In the present study, we found an association of TAT and recanalisation after logistic regression, when analysed as a categorical variable, while no association could be observed when analysed as a continuous variable. However, TAT was associated with recanalisation at a significant level when analysed as continuous before logistic regression (Table 1). Nevertheless the level of significance obtained for TAT was lower for the categorical analysis than for the continuous one. This is probably due to the sample size needed. Indeed, using the Ene software, we calculated that the analysis of TAT as a continuous variable required a sample size of 189 compared to 100 as categorical. We can then speculate that the power to observe an association after logistic regression was too low and thus the results did not reach significance. We believe that a bigger sample size could permit to observe an association of TAT with recanalisation also as a continuous variable; however this point would have to be confirmed by another independent study.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish government (grant FIS 06/0586), Fundación Mutua Madrileña 2006, Fundación Ramon Areces 2007 and the Spanish stroke research network RENEVAS. The authors thank Ana Penalba and Laura Ortega for excellent technical support.

References

1. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581–1587.
2. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. SITS-MOST investigators. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007; 369: 275–282.
3. Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, et al. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuous monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring. *Stroke* 2000; 31: 2821–2827.
4. Molina CA, Montaner J, Abilleira S, et al. Time course of tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute cardioembolic stroke: a case-control study. *Stroke* 2001; 32: 2821–2827.
5. Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2004; 35: 2123–2127.
6. Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost* 2004; 91: 1146–1151.
7. Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Alvarez-Sabin J, et al. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2006; 398: 167–171.
8. Gonzalez-Conejero R, Fernandez-Cadenas I, Iniesta JA, et al. Proyecto Ictus Research Group Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke* 2006; 37: 2288–2293.
9. Rosell A, Alvarez-Sabin J, Arenillas JF, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke* 2005; 36: 1415–1420.
10. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107: 598–603.
11. Castellanos M, Leira R, Serena J, et al. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 1671–1676.
12. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32.
13. Yang DT, Flanders MM, Kim H, et al. Elevated factor XI activity levels are associated with an increased odds ratio for cerebrovascular events. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 411–415.
14. Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, et al. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 2008; 111: 4113–4117.
15. Santamaria A, Martínez-Rubio A, Mateo J, et al. Homozygosity of the T allele of the 46 C→T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for acute coronary artery disease in the Spanish population. *Haematologica* 2004; 89: 878–879.
16. Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, et al. Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1862–1868.
17. Tanne D, Macko RF, Lin Y, et al. NINDS rtPA Stroke Study Group. Hemostatic activation and outcome after recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37: 1798–1804.
18. Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007; 38: 967–973.
19. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke* 1993; 24: 35–41.
20. Brott TG, Haley EC, Levy DE, et al. Urgent therapy for stroke, part I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke* 1992; 23: 632–640.
21. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, et al. Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2001; 32: 89–93.
22. Burgin WS, Malkoff M, Demchuk AM, et al. Transcranial Doppler ultrasound criteria for recanalization after thrombolysis for middle cerebral artery stroke. *Stroke* 2000; 31: 1128–1132.
23. Ribo M, Molina CA, Rovira A, et al. Safety and efficacy of intravenous tissue plasminogen activator stroke treatment in the 3- to 6-hour window using multimodal transcranial Doppler/MRI selection protocol. *Stroke* 2005; 36: 602–606.
24. Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* 1990; 13: 271–289.
25. Clark RA, Watanabe AT, Bradley WG, et al. Acute hematomas: effects of deoxygenation, hematocrit, and fibrin-clot formation and retraction on T2 shortening. *Radiology* 1990; 175: 201–206.
26. Atlas SW, Mark AS, Grossman RI, et al. Intracranial hemorrhage: gradient-echo MRI imaging at 1.5T—comparison with spin-echo imaging and clinical applications. *Radiology* 1988; 168: 803–807.
27. Hayman LA, Ford JJ, Taber KH, et al. T2 effect of hemoglobin concentration: assessment with in vitro MR spectroscopy. *Radiology* 1988; 168: 489–491.
28. Hayman LA, Taber KH, Ford JJ, et al. Effect of clot formation and retraction on spin-echo MR images of blood: an in vitro study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1989; 10: 1155–1158.
29. Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, et al. Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991; 83: 937–944.
30. Scharfstein JS, Abendschein DR, Eisenberg PR, et al. for the TIMI-5 Investigators. Usefulness of fibrinolytic and procoagulant markers during thrombolytic therapy in predicting clinical outcomes in acute myocardial infarction: Thrombolysis in Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 1996; 78: 503–510.
31. Ray KK, Morrow DA, Gibson CM, et al. for the ENTIRE-TIMI 23 Study Group. Predictors of the rise in vWF after ST elevation myocardial infarction: implications for treatment strategies and clinical outcome: an ENTIRE-TIMI 23 Substudy. *Eur Heart J* 2005; 26: 440–446.
32. Yamada K, Tsuji J, Kimura S, et al. Effects of argatroban and heparin on thrombus formation and tissue plasminogen activator-induced thrombolysis in a microvascular thrombosis model. *Thromb Res* 2003; 109: 55–64.
33. Morris DC, Zhang L, Zheng GZ, et al. Extension of the therapeutic window for recombinant tissue plasminogen activator with argatroban in a rat model of embolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2635–2640.
34. Kobayashi S, Tazaki Y. Effect of the thrombin inhibitor argatroban in acute cerebral thrombosis. *Semin Thromb Haemost* 1997; 23: 531–534.
35. Hosomi N, Naya T, Kohno M, et al. The Japan Standard Stroke Registry Study Group. Efficacy of anti-coagulant treatment with argatroban on cardioembolic stroke. *J Neurol* 2007; 254: 605–612.
36. LaMonte MP, Marshall LN, Wang DZ, et al. ARGIS-1 Investigators. Argatroban anticoagulation in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 1677–1682.
37. Sugg RM, Pary JK, Uchino K, et al. Argatroban tPA stroke study: study design and results in the first treated cohort. *Arch Neurol* 2006; 63: 1057–1062.

3.5 ENDOGENOUS ACTIVATED PROTEIN C PREDICTS HEMORRHAGIC TRANSFORMATION AND MORTALITY AFTER TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR TREATMENT IN STROKE PATIENTS. Cerebrovasc Dis. 2009;28:143-50.

Endogenous Activated Protein C Predicts Hemorrhagic Transformation and Mortality after Tissue Plasminogen Activator Treatment in Stroke Patients

Maite Mendioroz Israel Fernández-Cadenas José Alvarez-Sabín Anna Rosell
Dorita Quiroga Eloy Cuadrado Pilar Delgado Marta Rubiera Marc Ribó
Carlos Molina Joan Montaner

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

Key Words

Activated protein C · Coagulation · Stroke · Plasmin · Thrombolysis

Abstract

Background: Activated protein C (APC) is a plasma serine protease with systemic anticoagulant and a wide spectrum of cytoprotective activities that has been proposed as a promising therapy for acute stroke. Therefore, we sought to investigate the role of endogenous APC in human ischemic stroke. **Methods:** Our target were 119 consecutive patients with an ischemic stroke involving the middle cerebral artery territory who received tissue plasminogen activator (t-PA) within 3 h of symptom onset. APC was measured before, as well as 1 and 2 h after t-PA administration, and again at 12 and 24 h after stroke onset. Cranial tomography scan was obtained at admission and repeated at 24–48 h or when a neurological worsening occurred to rule out the presence of hemorrhagic complications. The functional outcome was evaluated by 3-month modified Rankin Scale. **Results:** A to-

tal of 117 t-PA-treated patients were finally included in the analyses. APC peaked at 1 h after t-PA administration (pre-treatment APC = $132.44 \pm 36.39\%$, 1-hour APC = $184.20 \pm 34.28\%$, 2-hour APC = $145.50 \pm 35.23\%$; $p < 0.0001$). Interestingly, a high 2-hour APC level was associated with parenchymal hemorrhages (OR = 25.19; 95% CI = 4.76–133.19; $p = 0.0001$) and mortality (OR = 13.8; 95% CI = 2.58–73.63; $p = 0.001$), in a logistic regression model. Our results remained significant after Bonferroni correction for multiple testing. **Conclusions:** A high endogenous APC level 2 h after t-PA administration is independently associated with hemorrhagic transformation and mortality in our cohort of stroke patients. Establishing any causal link for these relationships needs further research.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

This work was carried out at the Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Neurology Department, Internal Medicine Department, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Introduction

Despite declining mortality in recent years, stroke remains a major cause of death and morbidity in many Western countries. Currently, tissue-type plasminogen activator (t-PA) is the only approved therapy for acute ischemic stroke [1, 2]. Nevertheless, t-PA treatment has a narrow 3- to 6-hour efficacy time window, often fails to lyse clots and brain arteries reocclude in some cases following initial recanalization [3]. Moreover, it can also increase the risk of symptomatic brain hemorrhages by 6% [4] and might be associated with neurovascular toxicity [5–7]. Therefore, new therapies for ischemic stroke or combined strategies which add efficacy and safety to intravenous t-PA are needed.

Activated protein C (APC) is a plasma serine protease with systemic anticoagulant, anti-inflammatory and antiapoptotic activities [8–10]. Lately, APC direct vasculoprotective and neuroprotective activities have also been demonstrated [11–13]. In addition, it has recently been described that recombinant APC blocks brain hemorrhagic transformation after t-PA infusion in an embolic rodent stroke model [14]. Despite beneficial effects of exogenously administered APC in cerebral ischemia, no data regarding endogenous APC are available for humans receiving t-PA after ischemic stroke. We hypothesize that endogenous APC might be related to outcome if ischemic stroke patients are treated with t-PA.

Materials and Methods

Study Population

Our target group consisted of patients with acute ischemic stroke admitted to the emergency department of the Vall d'Hebron University Hospital within the first 3 h after symptom onset. Stroke onset was defined as the last time the patient was known to be without any neurological deficit. A total of 119 consecutive patients with a nonlacunar stroke involving the vascular territory of the middle cerebral artery (MCA) and documented vessel occlusion were evaluated. All of them underwent urgent carotid ultrasound and transcranial Doppler (TCD) examinations and received intravenous t-PA in a standard 0.9-mg/kg dose (10% bolus, 90% continuous infusion during 1 h). The only 2 patients with a clinically known inflammatory and malignant disease were excluded a priori from the final analysis. At last, 117 consecutive patients with a nonlacunar ischemic stroke were included in the study.

Clinical Protocol

A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. In order to identify the potential mechanism of cerebral infarction, a set of diagnostic tests was performed, consisting of electrocardiogram, chest radiography, complete blood

count and leukocyte differential, blood chemistry, carotid ultrasonography, TCD examination and noncontrast cranial tomography (CT). When indicated, some patients also underwent special coagulation tests, transthoracic echocardiography, magnetic resonance imaging and Holter electrocardiogram monitoring. With this information, previously defined etiologic subgroups were determined according to Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria [15].

Clinical examination was performed on admission and at 12, 24 and 48 h from symptom onset. Stroke severity was assessed with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). We defined neurological improvement as a decrease in the stroke score by ≥ 4 points and neurological deterioration as either death or an increase in the score by >4 points at 48 h [16]. Poor functional outcome was defined by modified Rankin Scale (mRS) score ≥ 2 at 3 months after stroke onset.

The study protocol was approved by the ethics committee of the hospital, and informed, written consent was obtained from all patients or their next of kin.

TCD Assessment

A standard TCD examination was performed in the emergency department before t-PA administration (<3 h). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate were measured at the time of each TCD recording. The TCD examination was performed with the Multi-Dop X4 TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz. The TCD findings were interpreted using the Thrombolysis in Brain Ischemia flow grading system [17].

Proximal MCA occlusion was defined as the absence of flow or the presence of minimal flow signal throughout the MCA at an insonation depth between 45 and 65 mm. Distal MCA occlusion was defined as a diffuse dampening of the mean flow velocity in the affected MCA $>21\%$ compared with the unaffected MCA [18].

Computed Tomography

On admission, all patients underwent a CT scan within the first 3 h of stroke onset. No patient with a hypodensity involving $>33\%$ of the MCA territory received t-PA in this study. CT was repeated after 24–48 h (or earlier when rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence of hemorrhagic transformation. CT scans were reviewed by a neuroradiologist with extensive experience in acute stroke. Presence and type of hemorrhagic transformation were defined according to previously published criteria [19–23]. Hemorrhagic infarction was defined as a petechial infarction without space-occupying effect and parenchymal hematoma (PH) as hemorrhage with mass effect.

APC Determination

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry (before t-PA administration), at 1 and 2 h after the initiation of t-PA, and again at 12 and 24 h from stroke onset. EDTA tubes were used to collect the blood. Plasma was immediately separated by centrifugation at 3,000 rpm for 15 min at 4°C and stored at -80°C until analysis. The APC level was determined by a commercially available chromogenic assay (DG-Chrom PC, Grifols, Barcelona, Spain). All tests were performed according to the manufacturer's instructions and the value was expressed as a

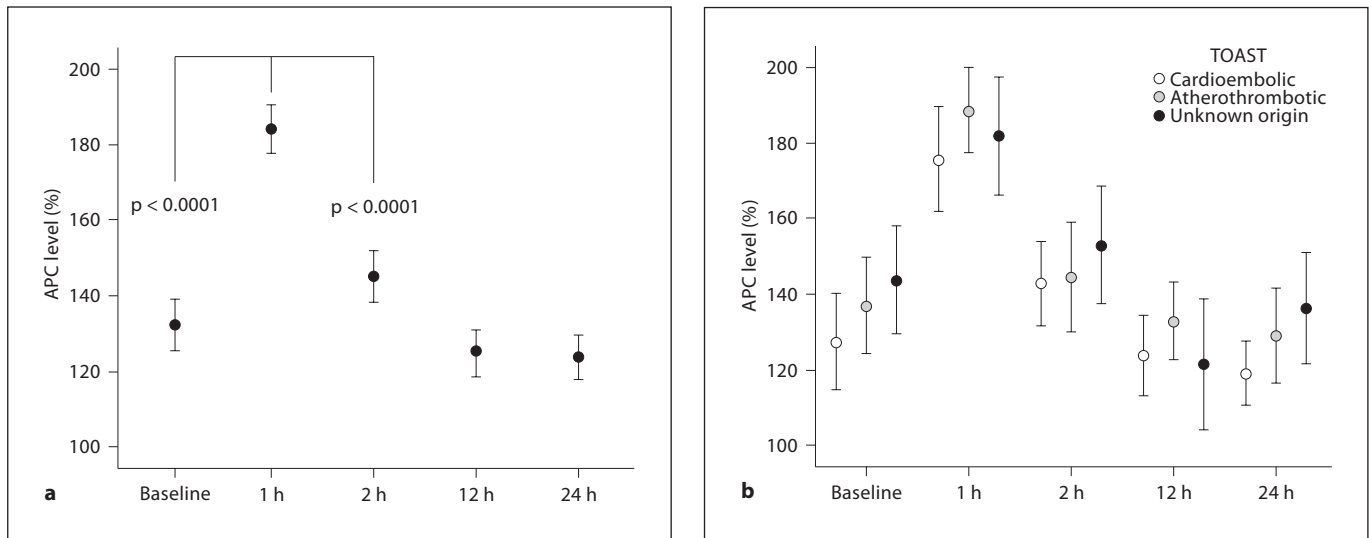


Fig. 1. a Temporal profile of plasma APC before and after t-PA infusion. The APC peak level was found at 1 h after t-PA administration. **b** Regarding stroke etiology no differences were found in the temporal profile. APC levels are reported as means \pm SD.

percentage of APC activity in comparison to standard calibration plasma or pooled normal plasma. The mean intra-assay coefficient of variation was 5.4%. Laboratory data remained blinded to clinical and radiological details.

Statistical Analysis

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and comparisons were made by means of the Statistical Product and Service Solutions (SPSS) statistical package, version 15.0. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the Pearson χ^2 test for categorical variables and the Student t test and ANOVA for continuous variables. Endogenous APC values were normally distributed (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot). Pearson's correlation coefficient was used to determine correlations between APC and other continuous variables. To calculate the sensitivity and specificity for APC values to predict mortality and hemorrhagic transformation, a receiver operating characteristic curve was configured. A logistic regression analysis was performed to determine factors that could be independently associated with mortality or hemorrhagic transformation. A probability (p) value <0.05 was considered statistically significant. We additionally performed a Bonferroni correction to avoid a false-positive finding due to multiple testing. All data are presented as means \pm standard deviation (SD).

Results

We finally included 117 patients with an acute ischemic stroke involving the MCA territory who received intravenous t-PA according to the National Institutes of Neurological Disorders criteria. Their mean age was 71.8

\pm 11.4 years (range = 26–91) and 69 patients (59%) were men. A total of 49.1% of all patients were hypertensive, 35.1% were dyslipemic, 15% had a history of diabetes mellitus, 22.9% were smokers, and atrial fibrillation was present in 39.8%. The median pretreatment NIHSS score was 17 (range = 4–28). Baseline TCD detected a proximal MCA occlusion in 88 (77.9%) and a distal occlusion in 25 (22.1%) of the patients. Among the recruited patients, 55 (49.1%) had a cardioembolic stroke, 32 (28.6%) had an atherothrombotic stroke, and 25 (22.3%) remained undetermined according to TOAST criteria.

The temporal profile of APC after stroke is shown in figure 1. The pretreatment mean APC level was $132.44 \pm 36.39\%$ and a peak level of APC was found at 1 h after t-PA administration ($184.20 \pm 34.28\%$; $p < 0.0001$), which significantly decreased on follow-up determinations (2 h: $145.50 \pm 35.23\%$; 12 h: $125.37 \pm 33.80\%$; 24 h: $124.66 \pm 33.80\%$; $p < 0.0001$). This temporal profile was similar in all studied stroke etiologies as shown in figure 1b.

Among the cardiovascular risk factors, patients with a history of hypercholesterolemia showed higher pretreatment levels of APC ($p = 0.001$; table 1) and those with atrial fibrillation had lower levels of APC ($p = 0.006$; table 1). No relationship was found between APC level and stroke severity (NIHSS) (data not shown). The APC concentration was similar regarding the presence of proximal or distal MCA occlusion at patient arrival ($132.44 \pm$

Table 1. Pretreatment APC level and presence of several risk factors in the whole study population and in patients with a proximal MCA occlusion

Risk factor	Pretreatment APC level, % activity					
	all patients (n = 117)			proximal MCA occlusion (n = 88)		
	yes	no	p	yes	no	p
Male	128.7 ± 30.6	137.6 ± 43.0	0.202	129.4 ± 31.3	136.0 ± 44.0	0.426
Tobacco use	135.9 ± 33.3	131.0 ± 37.6	0.547	135.5 ± 31.3	130.4 ± 38.7	0.562
Hypertension	133.5 ± 41.1	132.0 ± 32.7	0.994	135.2 ± 43.5	129.3 ± 29.8	0.467
Diabetes mellitus	143.2 ± 43.8	130.8 ± 35.5	0.205	141.4 ± 43.8	130.6 ± 36.2	0.392
Hypercholesterolemia	147.1 ± 30.2	112.4 ± 38.6	0.001 ^a	146.9 ± 30.9	123.4 ± 39.5	0.003 ^a
Atrial fibrillation	120.3 ± 38.6	140.8 ± 33.6	0.006 ^a	120.1 ± 38.8	141.0 ± 31.5	0.013 ^a
Previous acute MI	145.1 ± 39.4	130.7 ± 36.3	0.202	159.4 ± 38.7	128.8 ± 36.2	0.038 ^a
Previous stroke	118.6 ± 34.0	134.5 ± 36.6	0.104	118.3 ± 37.8	134.9 ± 37.3	0.163

Figures are means ± SD. MI = Myocardial infarction. ^a Factors with a p value of <0.05.

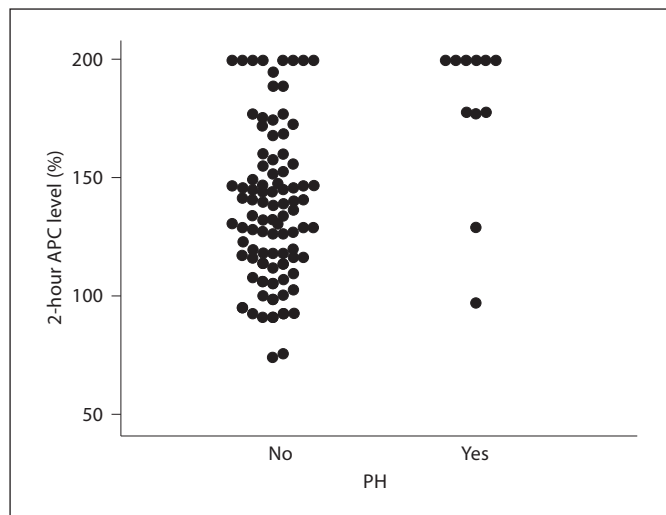


Fig. 2. Original values of 2-hour APC level regarding the presence of PH. This scatterplot shows that the values of 2-hour APC were higher in the patients who developed a PH.

37.61 vs. 130.66 ± 34.75%; p = 0.836) and there was no difference regarding etiologic subtypes.

We found that a PH was present in 13 patients (11.1%) after t-PA infusion. We did not observe any significant differences regarding baseline clinical data between the patients who developed a PH and the rest of the patients (table 2). Consistently, PH patients showed poorer outcomes concerning neurological deterioration, mRS and mortality rate (table 2). Although the endogenous base-

line APC level was not associated with hemorrhage, a significantly increased APC level at 2 h after t-PA treatment (2-hour APC) was found among patients who developed a PH (178.09 ± 34.44 vs. 139.58 ± 32.36%; p = 0.0001) (fig. 2). We did not find any association between hemorrhage and APC level at any other time point (fig. 3). In addition, a cut-point for 2-hour APC of 176% was identified in the receiver operating characteristic curve and used in the multivariate analysis. This cut-point had a sensitivity of 81.8% and a specificity of 84.1% to detect the presence of PH with a positive predictive value of 81.8% and a negative predictive value of 84.6%. Taking into account neurological, neuroimaging and hemodynamic details, no significant differences were found between both groups of patients (data not shown). In a logistic regression model, 2-hour APC level >176% (OR = 25.19; 95% CI = 4.76–133.19; p = 0.0001) was the only independent factor significantly associated with PH. The analysis was adjusted for potential confounders such as gender, age, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, tobacco use, atrial fibrillation, coronary disease, previous stroke, stroke severity (NIHSS), time to treatment, blood pressure level, etiology and occlusion localization. This association was maintained when a Bonferroni correction was applied (p_{corrected} = 0.0002).

Nineteen patients died during the study period. The patients' main baseline characteristics regarding mortality are shown in table 3. Among demographic data and cardiovascular risk factor profile, older patients, hypertensive patients and those who had atrial fibrillation showed the highest mortality rates. Endogenous 2-hour

Table 2. Clinical characteristic of patients regarding the presence of PH

Clinical data	PH yes	PH no	p value
Male	53.8	57.0	0.830
Age, years	72.54 ± 7.64	71.57 ± 12.08	0.779
Tobacco use	16.7	24.4	0.553
Hypertension	53.8	47.3	0.656
Diabetes mellitus	15.4	7.7	0.411
Hypercholesterolemia	30.8	36.7	0.679
Atrial fibrillation	30.8	40.7	0.495
Previous acute MI	7.7	12.1	0.643
Previous stroke	15.4	14.4	0.928
Proximal occlusion	76.9	78.0	0.929
Cardioembolic stroke	53.8	48.4	0.908
Median pretreatment NIHSS score	18	16	0.197
Baseline APC, % activity	130.69 ± 39.37	132.43 ± 36.35	0.873
Two-hour APC % activity	178.09 ± 34.44	139.58 ± 32.36	0.0001 ^a
Worsening (48 h)	25.0	6.5	0.038 ^a
Mortality	38.5	11.8	0.026 ^a
mRS >2	83.3	51.2	0.036 ^a

Values are expressed as means ± SD or percentages unless otherwise indicated. MI = Myocardial infarction.

^a Factors with a p value of <0.05.

APC was higher in patients who died after thrombolysis compared to survivors (165.47 ± 37.29 vs. 141.44 ± 33.61%; p = 0.009) (table 3). There was no relationship between endogenous APC measured at any other time point and mortality. A cut point level >157% was obtained from the receiver operating characteristic curve which showed the best sensitivity and specificity to predict mortality. In a logistic regression model, after adjustments for potential confounders, 2-hour APC level >157% (OR = 13.8; 95% CI = 2.58–73.63; p = 0.001) was independently associated with mortality. This link was confirmed even after Bonferroni correction (p_{corrected} = 0.002). In addition, we found the age >77 years (OR = 1.13; 95% CI = 1.02–1.26; p = 0.017; p_{corrected} = 0.047) being independently associated with mortality in this model (fig. 4).

Discussion

We have found that endogenous APC increases following t-PA administration and that increased APC is inversely correlated to safety of stroke thrombolysis in

Table 3. Main factors associated with mortality

	All Patients		
	survival (n = 98)	mortality (n = 19)	p
Mean age, years	70.33	78.89	0.0001 ^a
Male, %	59.4	52.6	0.618
Tobacco use, %	23.9	17.6	0.419
Hypertension, %	41.9	84.2	0.001 ^a
Diabetes mellitus, %	16.0	10.5	0.422
Atrial fibrillation, %	34.0	68.4	0.006 ^a
Previous acute MI, %	11.7	26.3	0.100
Hypercholesterolemia, %	38.7	16.7	0.060
Previous stroke, %	11.8	26.3	0.104
Proximal occlusion, %	75.8	88.9	0.181
Cardioembolic stroke, %	45.2	68.4	0.175
Mean SBP, mm Hg	153.04	165.11	0.062
Mean DBP, mm Hg	82.70	87.58	0.145
Median NIHSS score	15.19	16.7	0.188
Mean baseline APC, % activity	135.21	119.52	0.090
Mean 1-hour APC, % activity	182.83	190.63	0.367
Mean 2-hour APC, % activity	141.44	165.47	0.009 ^a
Mean 12-hour APC, % activity	126.17	116.60	0.306
Mean 24-hour APC, % activity	124.65	117.15	0.415

MI = Myocardial infarction; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure.

^a Factors with a p value of <0.05.

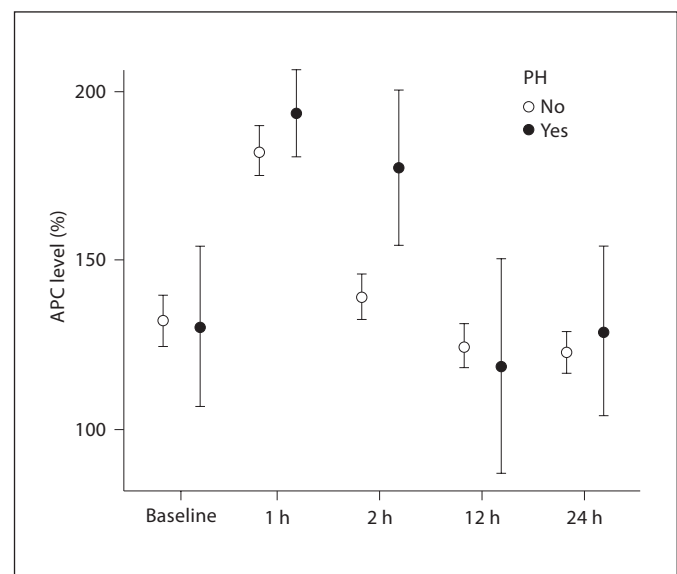


Fig. 3. Temporal profile of endogenous APC in stroke patients treated with t-PA regarding the presence of brain hemorrhages. Patients who developed a PH showed a higher and more sustained peak of APC after t-PA infusion. APC levels are reported as means ± SD.

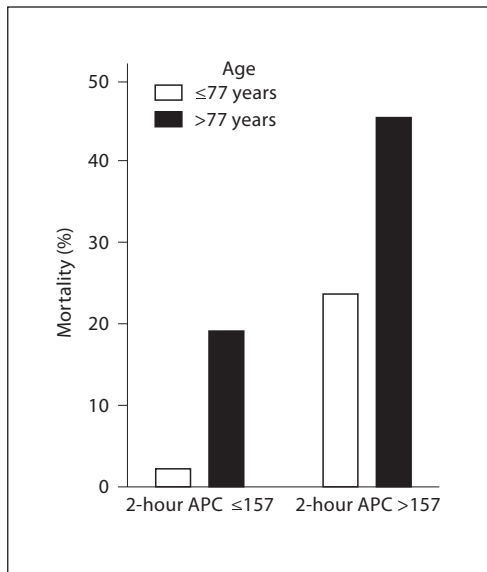


Fig. 4. Mortality prediction among t-PA-treated patients. Mortality prediction among t-PA-treated patients with a proximal MCA occlusion according to combination of two independent variables in the logistic regression model (endogenous 2-hour APC and age).

our cohort of patients. In fact, a strong independent association of increased APC measured 2 h after t-PA administration with parenchymal hemorrhage and mortality rate is highly suggested.

Several methodological issues should be considered before we interpret the results. Only CT scanning is available for our patients during the acute phase, so subtle hemorrhagic transformation could have been missed. In addition, MCA occlusion detection relies only upon TCD. Nevertheless, other more sensitive techniques for brain and vessel imaging assessment, such as gradient echo magnetic resonance imaging, are not usually available within the first 3 h after stroke onset at the emergency department. All the same, the accuracy of CT for identifying brain hemorrhage and the advantage of TCD for monitoring the hemodynamic status of acute ischemic stroke is beyond all doubt. Additionally, it would be highly suitable to reproduce our results in an independent cohort of stroke patients before practical clinical measures arise from our results.

Endogenous APC is a plasma serine protease with systemic anticoagulant and cytoprotective properties [24]. Physiological activation of protein C occurs on the platelet and endothelial cell surface by thrombin-thrombomodulin complexes, converting to APC. The anticoagu-

lant actions of APC involve irreversible proteolytic inactivation of coagulation factors Va and VIIIa, which are required to sustain thrombin formation, and thereby, APC blocks the amplification of the coagulation system. In addition, APC limits subsequent activation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor [25] and it has been shown to inactivate type 1 plasminogen activator inhibitor, thus promoting fibrinolysis [26]. The crucial role of protein C as an anticoagulant is confirmed by clinical studies as protein C deficiency is linked with hypercoagulable states and recurrent thrombotic events [27]. Interestingly, we found that patients with atrial fibrillation showed a significantly lower level of pretreatment protein C in the bivariate analysis (table 1). A prothrombotic state has been previously described among nonvalvular atrial fibrillation patients, thus increasing the risk for embolism [28], and our finding would be in accordance with those studies, since a low protein C level may be associated with hypercoagulable states. Probably, it would be worth testing the protein C level as a prothrombotic marker of atrial fibrillation in further studies.

On the other hand, APC acts directly on cells to exert multiple cytoprotective effects including anti-inflammatory activities, antiapoptotic properties, endothelial barrier protection and modulation of gene expression [29]. Most of these cytoprotective functions are dependent on binding to endothelial cell protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor-1 (PAR-1) [30]. The EPCR can undergo translocation from the plasma membrane to the nucleus, where it redirects gene expression [31]. During translocation it can carry APC to the nucleus, possibly accounting for the ability of APC to modulate inflammatory mediator responses in the endothelium. Overall, this APC pathway is critical to both regulation of the blood coagulation process and control of the innate inflammatory response.

All these properties of endogenous APC are thought to be eligible for a therapeutic strategy against stroke. In fact, recombinant APC therapy has shown favorable effects on murine models of focal cerebral ischemia [13, 14]. After MCA occlusion, recombinant APC infusion has shown direct neuroprotective effects [32, 33]. Moreover, recombinant APC infusion synergistically reduces stroke damage when tested in combination with t-PA by inhibiting direct deleterious effects of t-PA on neurons [13, 14]. In fact, it has been suggested that recombinant APC might expand the t-PA therapeutic window [34, 35]. Recombinant APC is also promising in other fields, such as severe sepsis. In a mouse sepsis model, Kerschen et al. [36] have shown that a recombinant APC variant with normal

cytoprotective signaling but <10% anticoagulant activity was as effective as wild-type APC in reducing mortality.

Nevertheless, the role that endogenous APC plays in human acute stroke in vivo is not yet well understood. In the present report, we sought to investigate whether the endogenous plasma APC level might be related to safety in stroke patients who receive t-PA treatment. Clearly, this study shows for the first time that a high endogenous APC level measured 2 h after t-PA treatment is strongly associated with hemorrhagic transformation, the most feared complication of this drug. In a similar way, unfavorable associations between preoperative and peak APC levels and postoperative hemodynamics after coronary artery bypass surgery have been reported [37]. Hence, the endogenous 2-hour APC level might be a useful prognostic tool if further research confirms this association and stroke patients with a high 2-hour APC level should receive particular attention because they may have unacceptably high hemorrhagic and mortality rates. As a limitation, there is only 1 patient with symptomatic hemorrhagic transformation in our study. Therefore, this low number precludes extending our results to all serious brain bleedings.

Although the APC increase following thrombolytic treatment is well known [38], its association with t-PA-induced hemorrhages has not been previously recognized. While this relationship may be correlative and not causative, the link between endogenous plasma APC level and hemorrhagic transformation might be reasonably explained by its anticoagulant properties. The higher the endogenous APC at 2 h after t-PA infusion, the more the risk for brain hemorrhage. However, it surprisingly contrasts with the results of animal model studies which recently have demonstrated that recombinant APC substantially reduces t-PA-induced hemorrhage [14, 39], probably because of preserving the integrity of endothelial barriers [29]. It could be possible that in human ischemic stroke, anticoagulant and fibrinolytic activities of endogenous APC exceed neuroprotective actions. An alternative explanation might be that high endogenous APC is just an insufficient response to solve brain damage associated with brain hemorrhages. However, and although no causal link may be derived from our study, the increase in APC following t-PA used to precede the appearance of hemorrhagic transformation. We consider a limitation of this study the lack of data in consecutive stroke patients not receiving t-PA. Therefore, either stroke or t-PA or both might increase the endogenous APC level. Nevertheless, obtaining such a control group with patients not given t-PA would raise major ethical considerations. Whichever factor is raising endogenous APC, the

fact is that a high level at 2 h after thrombolytic therapy is independently associated with hemorrhagic transformation and a high mortality rate.

On the other hand, when recombinant APC has been administered in humans, as in the Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis trial, the most notable adverse event has been serious hemorrhage (2.1 vs. 0.7%, recombinant APC vs. placebo; $p < 0.01$) [40]. Likewise, data from a recent meta-analysis assessing the safety and efficacy of recombinant APC in 4,911 patients with sepsis showed a higher incidence of serious hemorrhagic events in the treatment group (RR = 1.48; 95% CI = 1.07–2.06; $p = 0.02$; $I^2 = 8\%$) [41]. Overall, these data and our results would raise serious concerns about the safety of combining t-PA and recombinant APC for acute stroke treatment. Fortunately, in basic and preclinical research, it has been shown that APC structural features mediating anticoagulant actions are distinct from those mediating cytoprotective actions [29]. Thus, in order to avoid this deleterious effect, recombinant APC variants with reduced anticoagulant activity while providing cytoprotective benefits have been generated [42] and could be safer among stroke patients cotreated with t-PA.

In conclusion, this study demonstrates a significant but unexpected relationship between endogenous APC level and thrombolytic therapy safety. Despite APC beneficial properties, and taking into account differences between endogenous and exogenous APC, our hemorrhage and mortality results force us to be cautious when using protein C in future human stroke trials.

Acknowledgments

We thank the neuroradiologists, residents and nurses of the emergency department and especially the stroke patients for their invaluable help in performing this study.

References

- 1 NINDS tPA Stroke Study Group: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995;222:1581–1587.
- 2 IMS II Trial Investigators: The Interventional Management of Stroke (IMS) II study. *Stroke* 2007;38:2127–2135.
- 3 Alexandrov AV, Grotta JC: Arterial re-occlusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 2002;59:862–867.
- 4 NINDS tPA Stroke Study Group: Intracerebral hemorrhage after intravenous rt-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:2029–2118.

- 5 Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, et al: Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after local cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 1998;4:228–231.
- 6 Matys T, Strickland S: Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat Med* 2003;9:371–373.
- 7 Nicole O, Docagne F, Ali C, et al: The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001;7:59–64.
- 8 Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al: Gene expression profile of anti-thrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:11199–11203.
- 9 Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880–1882.
- 10 Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al: Activated protein C prevents neuronal apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003;9:338–342.
- 11 Guo H, Liu D, Gelbard H, et al: Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004;41:563–572.
- 12 Feistritz C, Riewald M: Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005;105:3178–3184.
- 13 Liu D, Cheng T, Guo H, et al: Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med* 2004;10:1379–1383.
- 14 Cheng T, Petraglia AL, Li Z, et al: Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med* 2006;12:1278–1285.
- 15 Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al: 3rd classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. *Stroke* 1993;24:35–41.
- 16 Brott TG, Haley EC, Levy DE, et al: Urgent therapy for stroke. I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 min. *Stroke* 1992;23:632–640.
- 17 Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, et al: Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2001;32:89–93.
- 18 Zanette EM, Roberti C, Mancini G, et al: Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke* 1995;26:430–433.
- 19 Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al: Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995;274:1017–1025.
- 20 Pessin M, del Zoppo G, Estol C: Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* 1990;13:271–289.
- 21 Aygun N, Masaryk TJ: Diagnostic imaging for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am* 2002;13:313–334.
- 22 Holscher T, Schlachetzki F, Zimmermann M, Jakob W, Ittner KP, Haslberger J, Bogdahn U, Boy S: Transcranial ultrasound from diagnosis to early stroke treatment. 1. Feasibility of prehospital cerebrovascular assessment. *Cerebrovasc Dis* 2008;26:659–663.
- 23 Kaps M, Stolz E, Allendoerfer J: Prognostic value of transcranial sonography in acute stroke patients. *Eur Neurol* 2008;59(suppl 1):9–16.
- 24 Esmon CT: The protein C pathway. *Chest* 2003;124:26–32.
- 25 Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB: The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996;88:2093–2100.
- 26 Salata Y, Curriden S, Lawrence D, et al: Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1121–1125.
- 27 Koster T, Rosendaal FR, Briët E, et al: Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995;85:2756–2761.
- 28 Inoue H, Nozawa T, Okumura K, Jong-Dae L, Shimizu A, Yano K: Prothrombotic activity is increased in patients with nonvalvular atrial fibrillation and risk factors for embolism. *Chest* 2004;126:687–692.
- 29 Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH: The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109:3161–3172.
- 30 Yang L, Bae JS, Manithody C, et al: Identification of a specific exosite on activated protein C for interaction with protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 2007;282:25493–25500.
- 31 Feistritz C, Riewald M: Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005;105:3178–3184.
- 32 Shibata M, Kumar SR, Amar A, et al: Anti-inflammatory, antithrombotic and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation* 2001;103:1799–1805.
- 33 Fernandez JA, Xu X, Liu D, et al: Recombinant murine activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:271–276.
- 34 Esmon CT: Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:49–60.
- 35 Griffin JH, Fernandez JA, Mosnier LO, et al: The promise of protein C. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:211–216.
- 36 Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H: Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007;204:2439–2448.
- 37 Raivio P, Fernandez JA, Kuitunen A, et al: Activation of protein C and hemodynamic recovery after coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:44–51.
- 38 Takazoe K, Ogawa H, Yasue H, et al: Association of plasma levels of activated protein C with recanalization of the infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1999;95:37–47.
- 39 Zlokovic BV, Zhang C, Liu D, et al: Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C. *Ann Neurol* 2005;58:474–477.
- 40 Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al: Recombinant human protein C worldwide evaluation in severe sepsis (PROWESS) study group: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699–709.
- 41 Martí-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF: Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;23:CD004388.
- 42 Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, et al: Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004;104:1740–1744.

**3.6 OSTEOPONTIN PREDICTS LONG-TERM FUNCTIONAL
OUTCOME AMONG ISCHEMIC STROKE PATIENTS. JOURNAL
OF NEUROLOGY. ARTÍCULO EN REVISIÓN.**

Osteopontin predicts long-term functional outcome among ischemic stroke patients

M Mendioroz MD¹, I Fernandez-Cadenas PhD¹, A Rosell PhD¹, P Delgado PhD¹, MD, S Domingues-Montanari MSc¹, M Ribó PhD², MD, A Penalba¹, M Quintana², J Álvarez-Sabín PhD, MD^{1,2}, J Montaner PhD, MD^{1,2}.

1. Neurovascular Research Laboratory. Hospital Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. Spain.
2. Neurovascular Unit. Neurology Service. Hospital Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. Spain.

ABSTRACT Objective: Osteopontin (OPN) is a multifunctional protein which has shown neuroprotective properties in animal models of cerebral ischemia. Nevertheless, its role in acute human stroke has not yet been established. Therefore, we aimed to determine human serum OPN level during acute ischemic stroke and its relationship with patient outcome. **Methods:** We measured OPN level in 178 consecutive patients with a middle cerebral artery occlusion who received fibrinolytic therapy and in 40 control subjects. OPN level was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bad functional outcome was defined by modified Rankin Scale (mRS) score >2 at 3 months after stroke onset. A logistic regression analysis was performed to determine factors that could be independently associated with poor prognosis. **Results:** OPN level among stroke patients did not differ from controls OPN level (16.65 vs 17.83 ng/mL; $p=0.404$). Interestingly, OPN level was increased among those patients who showed worse prognosis at 3 months (19.96 vs 15.48ng/mL; $p=0.040$). In a logistic regression model, OPN level > 27.22ng/mL was found to be an independent factor for bad outcome (OR 5.01, 95%CI 1.60-15.72, $p=0.006$) after adjusting for potential confounders. **Conclusions:** Those patients showing higher OPN level before tPA administration displayed worse prognosis compared to those with lower OPN level. Further research is necessary to elucidate the role of OPN in ischemic stroke pathophysiology and validate OPN as a useful tool to predict long-term stroke outcome.

INTRODUCTION

Stroke is a leading cause of serious, long-term disability in western countries and it has been estimated to account for approximately 1 of every 17 deaths in the United States in 2005.[21] Stroke is a highly disabling disease [3,7] and despite declining mortality rate in the last decades stroke remains a major cause of disease burden worldwide.

Osteopontin (OPN) is a secreted extracellular matrix protein that also acts as a potent inhibitor of soft tissue mineralization and thus, it is able to block ectopic calcification of the vasculature *in vivo* [14, 16, 28, 29] OPN is also a soluble cytokine involved in inflammation and tissue remodeling.[28] During acute and chronic inflammatory responses OPN is highly expressed by both macrophages and CD4⁺ lymphocytes and plays a functional role in early Th1 response.[15, 25] Because of all these properties, OPN is thought to exacerbate inflammation in several chronic diseases,

including atherosclerosis.[28] Indeed, OPN expression has been observed in smooth muscle cells in human atherosclerotic lesions, as well as in angiogenic endothelial cells and macrophages [14] and recently, the carotid plaque OPN level has been found to be a predictor for cardiovascular events in humans.[8]

On the other hand, OPN seems to play a role after brain injury [12, 18] and a potential neuroprotective effect of OPN has been suggested using both *in vitro* and *in vivo* models of ischemia. In fact, intracerebral ventricular and nasal administration of OPN caused a marked reduction in infarct size after transient middle cerebral artery occlusion in a murine stroke model. [10, 22] Despite all these data, little is known about OPN and its role in human stroke. Therefore, we aimed to determine human serum OPN level during acute ischemic stroke and its relationship with neurological outcome.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Consecutive patients with an acute stroke admitted to the Emergency Department of a University Hospital within the first 3 hours after symptom onset were recruited from December, 2006 to June, 2008. Stroke onset was defined as the last time the patient was known to be asymptomatic. Only those patients with a non-lacunar ischemic stroke involving the vascular territory of the middle cerebral artery (MCA) were included. Vessel occlusion was documented by transcranial Doppler (TCD) and all patients received intravenous tPA in a standard 0.9 mg/kg dose (10% bolus, 90% continuous infusion during 1 hour). We also measured serum OPN level among a group of control subjects elder than 65 years and free of clinical vascular diseases, including the presence of a previous stroke, myocardial infarction or angina and peripheral vascular disease. In addition, control subjects showed no family history of stroke. Recruitment was performed in our hospital and the subjects were directly interviewed before peripheral blood samples were drawn. Details on socio-economic and demographic characteristics were obtained from all subjects by standardized questionnaires, together with information on smoking, dyslipidemia, hypertension, diabetes mellitus, history of vascular diseases and current medication use.

Clinical Protocol

A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify the potential mechanism of cerebral infarction, a set of diagnostic tests were performed that included electrocardiogram (EKG), chest radiography, complete blood count and leukocyte differential, blood biochemistry, carotid ultrasonography, TCD examination and non-contrast cranial tomography (CT) in all patients. When indicated, some patients also underwent special coagulation tests, brain magnetic resonance imaging (MRI), transthoracic ecocardiography and Holter EKG monitoring. Considering this information, previously defined etiologic subgroups were determined using the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria.[1] Stroke was also classified according to the Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) criteria, based on clinical symptoms, location and

extent of cerebral infarction.[4] Clinical examination was performed on admission and at 12, 24, 48 hours from symptoms onset and daily until discharge. Stroke severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).[6] We defined neurological improvement as a decrease in stroke score by ≥ 4 points and neurological deterioration as either death or an increase in score by ≥ 4 points at 48 hours.[5] Bad functional outcome was defined by modified Rankin Scale (mRS) score > 2 at 3 months after stroke onset as usual and it was assessed by two neurologist (P.D and M.R.) who were blinded to OPN measurements. Death was assessed at 3 months and we included also those patients who died during the admission period.

TCD assessment

A standard TCD examination was performed in the Emergency Department before tPA administration (< 3 hours). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate were measured at the time of TCD recording. The TCD examination was performed with Multi-Dop X4 TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz. TCD findings were interpreted using the Thrombolysis in Brain Ischemia flow grading system.[9] Proximal and distal MCA occlusions were defined as previously reported.[31]

Computed Tomography

On admission, all patients underwent a CT scan within the first 3 hours of stroke onset. No patient with a hypodensity involving $> 33\%$ of the MCA territory received tPA in this study. CT was repeated after 24 to 48 hours (or earlier when rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence of hemorrhagic transformation (HT). CT scans were reviewed by a neuroradiologist with extensive experience in acute stroke. Presence and type of HT were defined according to previously published criteria.[17, 27] Hemorrhagic infarction (HI) was defined as a petechial haemorrhage without space-occupying effect, and parenchymal hematoma (PH) was defined as haemorrhage with mass effect.

OPN determination

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry, before tPA administration. Serum was immediately separated by centrifugation at 3,000 rpm for 15 minutes at 4°C and stored at -80°C. OPN level was determined by an ELISA SearchLight Custom Human Osteopontin Assay (Pierce, Rockford, ILL, USA). Enzyme-substrate reaction produces a chemiluminescent signal detected with a cooled CCD camera (Pierce). Images were analyzed by ArrayVision version 8.0 software (Imaging Research). The mean intra-assay coefficient of variation was 16.18%. OPN measurements were obtained by a technician who remained blinded to clinical and radiological details.

Statistical Analysis

Descriptive and frequency statistical analysis were obtained and comparisons were performed using the Statistical Product and Service Solutions (SPSS) statistical package, version 15.0. OPN values did not show a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot); therefore, values are expressed as median (interquartile range). Statistical significance for intergroup differences was assessed by the Pearson χ^2 test for categorical variables and the Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test for continuous variables. Spearman's coefficient was used to determine correlations between OPN and other continuous variables. To calculate the sensitivity and specificity for OPN values to predict prognosis, a receiver operating characteristic (ROC) curve was configured. Those factors related to poor functional status at 3 months (mRS>2) in the univariate analysis ($p<0.1$) were included in a logistic regression model, following the forward stepwise method, to identify variables independently associated with bad outcome. Finally, we performed a logistic regression analysis, following the enter method, to adjust the model for risk factors. A 2-tailed probability (p) value <0.05 was considered significant.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

This study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital located in Barcelona and all patients or relatives gave informed, written consent,

according to the World Medical Association Declaration of Helsinki.

RESULTS

Demographic and clinical baseline characteristics

We finally obtained serum OPN measurements in a total of 178 patients (see Fig 1). Mean age was 71.8 ± 13.3 years (range, 18 to 96 years) and 94 patients (52.8%) were male. Regarding risk factors, a total of 62.9% were hypertensive, 33.7% had dyslipemia, 21.9% had a history of diabetes mellitus, 15.2% were smokers and atrial fibrillation was present in 39.3% of all patients. Only diabetes and hypertension proportion were different between patients and controls as shown in table 1. Baseline TCD detected a proximal MCA occlusion in 50%, a distal occlusion in 47.2% of patients and a poor acoustic window limited occlusion assessment in 2.8% of patients. Among recruited patients, 50.3% had a cardioembolic stroke, 18.6% had an atherothrombotic stroke, 3.4% had other determined aetiology and 27.7% remained undetermined according to TOAST criteria. Regarding infarct location and extent, 79.1% of patients showed a total anterior circulation infarct (TACI) considering OCSP criteria and median pre-treatment NIHSS score was 16 (range 4 to 23). Neurological improvement was observed in 59.9% and worsening in 9% of patients within 48 hours. At discharge, 56.3% of patients improved and 10.8% worsened.

Factors related to serum OPN level

Serum OPN level was similar both in patients and controls (16.65 vs 17.83ng/mL; $p=0.404$). We then explored factors that might be related to serum OPN level among stroke patients, finding that smokers showed lower serum OPN level than those who did not smoke (11.31 vs 17.92 ng/mL; $p=0.010$). A positive correlation was also observed between OPN and age ($r^2=0.338$, $p<0.0001$). In addition, a trend was found with TOAST subtype, atherothrombotic patients showing higher OPN level than other subtypes (19.31 vs 14.86 ng/mL; $p=0.061$). We also found a trend with atrial fibrillation, the presence of a previous stroke and treatment with Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACE-I) (see table 2). We did not identify any relationship between OPN level and stroke

severity at baseline, determined by NIHSS ($p=0.495$). In our cohort, 37 patients showed any grade of HT in the control CT scan, but OPN level was similar in those patients with HT and those without bleeding (15.76 vs 17.19 ng/mL; $p=0.862$). Apart from that, OPN level was similar regarding the remaining demographic data, risk factors and clinical characteristics (see table 2). No statistical correction for multiple testing was made in this section since the purpose of this analysis was only exploratory to guide the construction of the logistic regression model.

Functional status and serum OPN levels

After the follow-up period, we registered functional status of 130 patients by mRS at 3 months after stroke onset. In the remaining 48 patients we were not able to record functional status by mRS at 3 months due to different causes of lost in follow-up, mainly because these patients were followed up in other hospitals. However, no difference was found between those patients with 3 months functional assessment available and those with a lack of follow-up evaluation, regarding demographic data, vascular risk factors, clinical characteristics, and also OPN level.

Finally, we found that 72 patients of the total follow-up patients (55.3%) displayed worse prognosis ($mRS>2$). Among clinical characteristics, age, presence of atrial fibrillation, atherothrombotic stroke, previous stroke, stroke severity assessed by NIHSS and OCSP and a proximal location of vessel occlusion were different between patients who showed worse prognosis and those with better one (see table 3). As expected, neurological improvement was more frequent among those patients with better outcome (see table 3) and OPN level was similar considering clinical evolution within the first 48 hours. Moreover, OPN level was higher among those patients who showed worse prognosis than those with better mRS score at 3 months (19.96 vs 15.48ng/mL; $p=0.040$). Regarding mortality, patients who died showed a higher OPN level than those who were alive at 3 months (23.55 vs 16.07ng/mL; $p=0.043$). After performing a ROC curve, a cut-point for OPN level was identified (27.22 ng/mL) and subsequently used in the multivariate analysis.

In a logistic regression model, OPN level > 27.22 ng/mL was an independent factor for

bad outcome ($mRS>2$) (OR 5.40, 95%CI 1.80-16.17, $p=0.003$) (see table 4). After adjusting for potential confounders such as gender, age, hypertension, dyslipemia, diabetes, tobacco use, atrial fibrillation, coronary disease, previous stroke, pre-treatment stroke severity (NIHSS), atherothrombotic disease and occlusion location the association remained (OR 5.01, 95%CI 1.60-15.72, $p=0.006$) (see Fig 2). We also found that atherothrombotic strokes (OR 4.68, 95%CI 1.25-17.54, $p=0.022$) and the presence of proximal MCA occlusion (OR 5.53, 95%CI 2.12-14.43, $p=0.0004$) (see Fig 3) were predictors of bad long-term prognosis in the adjusted model. A trend was also observed regarding age for predicting bad prognosis (OR 1.04, 95%CI 1.00-1.08, $p=0.051$) (see Fig 3) (see table 4).

DISCUSSION

In the present study, we show that serum OPN level before tPA administration is independently associated with bad long-term outcome among acute ischemic stroke patients. In this regard, several mechanisms can be proposed to account for this result.

OPN plays a role in several chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis. Indeed, OPN is a T-helper 1 cytokine that recruits and retains monocyte-macrophages at the inflammatory site and regulates the production of several cytokines in macrophages, dendritic cells and T-cells. Interestingly, several proteins which also rise during inflammatory reaction, such as lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and high-sensitivity C-reactive protein (CRP), have also been associated with bad outcome among stroke patients.[11, 20, 24] It has been described that high Lp-PLA2 level predicted mortality, stroke or myocardial infarction after a first-ever ischemic stroke. In addition, our group has showed that elevated level of high-sensitivity CRP measured at admission, predicts mortality in a cohort of tPA-treated stroke patients. Furthermore, OPN has previously been investigated as a prognostic tool for coronary patients. OPN was found to be an independent predictor for recurrent cardiovascular events in a group of 130 patients undergoing percutaneous coronary intervention, as did CRP.[19] Nevertheless, the mechanisms linking these inflammatory

proteins to poor stroke outcome are still unknown.

On the other hand, recent evidence points to the potential protective role of exogenous OPN in ischemic brain damage. *In vitro* experimental models of ischemia have shown that incubation of cortical neuron cultures with OPN protects against cell death from oxygen and glucose deprivation.[22] Moreover, intracerebral ventricular administration of OPN caused a marked reduction in infarct size after a transient middle cerebral artery occlusion in a murine stroke model. [22] However, our data show that increased endogenous OPN level before tPA infusion is related to bad outcome and therefore, this would not support a neuroprotective function for OPN. Nevertheless, our study is not designed to probe causality and so, the association of high OPN level with bad outcome might also reflect an ineffective attempt of OPN neuroprotection. On the other hand, we know that OPN is a multifunctional protein and as such, some of its positive effects could be surpassed *in vivo* by the harmful ones. OPN processing might be crucial in this balance. Several matrix metalloproteinases (MMPs) cleave OPN, including MMP9.[30] This cleavage can potentially disrupt one of the integrin binding domains,[2] thus limiting some of the OPN beneficial effects. Likewise, OPN is cleaved by thrombin, exposing a cryptic binding domain and probably causing opposite cell responses.[13] Indeed, thrombin-cleaved OPN seems to be a twofold more effective neuroprotectant than the untreated molecule .[10] During the acute phase of ischemic stroke, both MMP-9 and thrombin could cleave OPN into several different fragments, then the final global effect of OPN would depend on the proportion and activity of these fragments. Further research is obviously necessary in human stroke patients for elucidating the role of both MMPs and thrombin cleaved-OPN fragments in ischemic stroke pathophysiology. In addition, it is not a rare result given that a long list of neuroprotective molecules have previously failed to be proven clinically useful in stroke treatment and translation of positive results obtained in animal models into the clinic are not generally successful.

Moreover, our study extends the current knowledge about the role of OPN in atherosclerotic disease. OPN has been reported to modulate proliferation, migration, and accumulation of smooth muscle and endothelial cells involved in repair and remodeling processes of the vasculature.[14] Additionally, OPN is a potent inhibitor of soft tissues mineralization, and thus may prevent vascular calcification.[29] All these properties point to a major role for OPN in plaque biology. In fact, OPN has been associated with the presence and the extent of coronary artery disease, independently of traditional risk vascular factors, [26] and OPN level correlated with the severities of both coronary and aortic atherosclerosis, in a recently published study [23]. Therefore, patients with atherothrombotic stroke would be expected to show high OPN levels since this protein has been related to atheromatous conditions. In this regard, a trend was found in our study between OPN and TOAST subtype, with atherothrombotic patients showing higher OPN level than other TOAST subtypes as shown in table 2.

This study has limitations. Before claiming clinical usefulness of these findings, the results presented here should be replicated in other stroke populations, including non tPA treated patients or in larger subset of atherothrombotic stroke. Indeed, due to the relatively low proportion of atherothrombotic stroke in our cohort a significant effect of OPN on atheroma pathophysiology could have been missed. Likewise, serial OPN measurements would be more informative, so in next future the assessment of a temporal OPN profile would be of great interest. It is also worth mentioning that we found no differences regarding serum OPN level between stroke patients and controls. Nevertheless, we can not definitely conclude about this finding since our study was designed to test OPN as a prognostic factor in the stroke population. Then, we used a control group only to explore the normal OPN level in the healthy population. On the other hand, although serum OPN levels were associated with increasing age and age was also associated with poor outcome in the univariate analysis, OPN remained as an independent predictor of worse outcome in the logistic regression

model. In addition, after adjusting the model for potential confounders, age was no longer an independent predictor of outcome (see table 4).

If replicated in another population, these findings might help us to offer objective prognostic information and to guide the management of the ischemic stroke patient. In fact, it is a recurrent situation that physicians are required by relatives and patients to predict the stroke patient outcome since arrival to the Emergency department. Given that we do not have useful tools to make such prediction nowadays, finding a prognosis biomarker is undoubtedly helpful for this purpose. Regarding patient management, to have a test that accurately predicts worsening might indicate using a more aggressive strategy in the first steps. On the other hand, a test that predicts improvement or an excellent outcome might also aid in patients allocation, since perhaps that specific patient will not benefit of attending the stroke unit. Moreover, elucidating the role that OPN plays in cerebrovascular diseases and its underlying mechanisms will improve our knowledge about the stroke pathophysiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to all study collaborators, residents, neurologists and nurses of the Stroke Unit and Neurology Ward from the Vall d'Hebron Hospital and especially to all the patients who participated in the study. We are also grateful for excellent statistical support from Giralt D and technical support from García-Menéndez S.

Conflicts of Interest: None

Funding sources

Dr MM is the recipient of a grant from the Instituto de Salud Carlos III for medical research training (FIS 05/00081), IF-C a post-doctoral grant from the Institute of Research Vall d'Hebron and SD-M a grant from the Ramón Areces Foundation. Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network RENEVAS (RD06/0026/0010). The project was funded in part by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI08/361). The funding source had no

involvement in the study design; collection, analysis and interpretation data; in the writing of the report; neither in the decision to submit the paper for publication.

REFERENCES

1. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, Stroke. 24 (1993) 35–41.
2. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L, Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin), J Biol Chem. 276 (2001) 28261–28267.
3. Asplund K, Stegmayr B, Peltonen M, From the twentieth to the twenty-first century: a public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, (Eds), Cerebrovascular Disease Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Vol 2. Blackwell Science, Malden, Mass, 1998, chap 64.
4. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C, Classification and natural history of clinical subtypes of cerebral infarction, Lancet. 337 (1991) 1521-1526.
5. Brott TG, Haley EC Jr, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes, Stroke. 23 (1992) 632-640.
6. Brott T, Bogousslavsky J, Treatment of acute ischemic stroke, N Engl J Med. 343 (2000) 710-722.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults: United States, 1999, MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 50 (2002)120-125.
8. de Kleijn DP, Moll FL, Hellings WE, Ozsarlak-Sozer G, de Bruin P, Doevendans

- PA, Vink A, Catanzariti LM, Schoneveld AH, Algra A, Daemen MJ, Biessen EA, de Jager W, Zhang H, de Vries JP, Falk E, Lim SK, van der Spek PJ, Sze SK, Pasterkamp G, Local Atherosclerotic Plaques Are a Source of Prognostic Biomarkers for Adverse Cardiovascular Events, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec 17 [Epub ahead of print]
9. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV, Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator, *Stroke.* 32 (2001) 89-93.
 10. Doyle KP, Yang T, Lessov NS, Ciesielski TM, Stevens SL, Simon RP, King JS, Stenzel-Poore MP, Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke, *J Cereb Blood Flow Metab.* 28 (2008) 1235-1248.
 11. Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL, High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke, *Arch Intern Med.* 166 (2006) 2073-2080.
 12. Ellison JA, Velier JJ, Spera P, Jonak ZL, Wang X, Barone FC, Feuerstein GZ, Osteopontin and its integrin receptor alpha(v) beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke, *Stroke.* 29 (1998) 1698-1706.
 13. Gao YA, Agnihotri R, Vary CP, Liaw L, Expression and characterization of recombinant osteopontin peptides representing matrix metalloproteinase proteolytic fragments, *Matrix Biol* 23 (2004) 457-466.
 14. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM, Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques, *J Clin Invest.* 92 (1993): 1686-1696.
 15. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M, Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo, *Am J Pathol* 152 (1998) 353-358.
 16. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H, Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin, *Circ Res.* 96 (2005) 717-722.
 17. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH, Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS), *JAMA* 274 (1995) 1017-1025.
 18. Iwanaga Y, Ueno M, Ueki M, Huang CL, Tomita S, Okamoto Y, Ogawa T, Ueda N, Maekawa N, Sakamoto H, The expression of osteopontin is increased in vessels with blood-brain barrier impairment, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34 (2008) 145-154.
 19. Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Taniguchi H, Arakawa K, Nakamura H, Ohsuzu F, Prognostic significance of plasma osteopontin levels in patients undergoing percutaneous coronary intervention, *Circ J.* 73 (2009) 152-157.
 20. Lip GY, Patel JV, Hughes E, Hart RG, High-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand as indices of inflammation and platelet activation in 880 patients with nonvalvular atrial fibrillation: relationship to stroke risk factors, stroke risk stratification schema, and prognosis, *Stroke.* 38 (2007) 1229-1237.
 21. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenland K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation.* 119 (2009) 480-6.

22. Meller R, Stevens SL, Minami M, Cameron JA, King S, Rosenzweig H, Doyle K, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP, Neuroprotection by osteopontin in stroke, *J Cereb Blood Flow Metab.* 25 (2005) 217-225.
23. Momiyama Y, Ohmori R, Fayad ZA, Kihara T, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Nagata M, Nakamura H, Ohsuzu F, Associations between plasma osteopontin levels and the severities of coronary and aortic atherosclerosis, *Atherosclerosis.* 2010 Jan 4. [Epub ahead of print]
24. Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Ribó M, Huertas R, Rosell A, Penalba A, Ortega L, Chacón P, Alvarez-Sabín J, Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis, *Stroke.* 37 (2006) 1205-1210.
25. O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS, Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells, *J Leukoc Biol.* 68 (2000) 495–502.
26. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, Ohsuzu F, Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease, *Atherosclerosis.* 170 (2003) 333–337.
27. Pessin M, del Zoppo G, Estol C, Thrombolytic agents in the treatment of stroke, *Clin Neuropharmacol.* 13 (1990): 271–289.
28. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM, Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 (2007) 2302-2309.
29. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM, Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo, *J Exp Med.* 196 (2002) 1047–1055.
30. Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW, An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma, *Oncogene.* 26 (2007) 6361-6371.
31. Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D, Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler, *Stroke.* 26 (1995) 430–433.

Table 1. Independent predictors of bad outcome in the crude and adjusted multivariable analysis.

Independent Predictors of Bad Outcome	Crude	Crude	Adjusted	Adjusted
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
OPN >27.22 ng/mL	5.40 (1.83-16.17)	0.003	5.01 (1.6-15.72)	0.006
Atherothrombotic aetiology	3.46 (1.19-10.06)	0.022	4.68 (1.25-17.54)	0.022
Age	1.04 (1.01-1.08)	0.007	1.04 (1.00-1.08)	0.051
Proximal MCA occlusion	5.35 (2.25-12.74)	0.0001	5.53 (2.12-14.43)	0.0004

Supplemental-Table 1. Baseline differences between patients and controls are shown.

Factors	Patients n=178	Controls n=40	P value
Age mean \pm SD	71.91 \pm 8,1	71.5 \pm 13.4	0.887
Male % (n)	52.8% (94)	46.2% (18)	0.282
Smoking % (n)	16.0% (28)	20.5% (8)	0.319
Hypertension % (n)	62.9% (112)	35.9% (14)	0.002*
Diabetes Mellitus % (n)	21.9% (39)	7.7% (3)	0.028*
Hypercholesterolemia % (n)	33.9% (61)	28.2% (11)	0.314
OPN level (ng/mL)	16.65 (7.17-27.90)	17.83 (11.49-26.23)	0.404

OPN values are expressed as median (lower-upper quartile); * significant p-value < 0.05

Supplemental-Table 2. Serum OPN level regarding demographic data, risk factors and stroke clinical characteristics.

Factors	Yes	No	P value
Male	15.32 (6.71 to 26.50)	17.97 (6.29 to 30.07)	0.075
Smoking	11.31 (5.47 to 19.22)	17.92 (6.65 to 27.91)	0.010*
Hypertension	18.99 (8.29 to 30.23)	12.23 (5.76 to 24.64)	0.079
Diabetes Mellitus	16.15 (6.68 to 27.68)	15.91 (6.44 to 26.75)	0.894
Hypercholesterolemia	16.65 (8.04 to 26.50)	15.75 (6.29 to 28.13)	0.877
Atrial Fibrillation	21.06 (7.54 to 33.47)	14.86 (6.33 to 25.55)	0.056
Previous Stroke	25.64 (6.48 to 39.93)	15.21 (6.44 to 25.53)	0.058
ACE-I ¶ treatment	21.03 (9.18 to 31.40)	14.30 (5.90 to 26.05)	0.056
ARB ¥ treatment	13.83 (8.36 to 26.57)	15.95 (6.26 to 26.66)	0.676
Proximal occlusion	14.98 (5.41 to 29.69)	17.97 (10.70 to 27.12)	0.162
Atherothrombotic	19.31 (7.87 to 30.46)	14.86 (5.90 to 25.37)	0.061
Cardioembolic	19.29 (8.42 to 30.46)	15.48 (6.71 to 26.38)	0.172
TACI †	16.13 (6.22 to 27.53)	18.55 (12.31 to 37.76)	0.151
Neurological improvement, 48h.	17.45 (6.71 to 27.49)	16.15 (8.97 to 29.45)	0.737
Neurological worsening, 48h.	21.16 (17.70 to 41.99)	16.15 (7.14 to 27.86)	0.343
Hemorrhagic transformation	15.76 (6.57 to 30.46)	17.19 (7.15 to 28.13)	0.972
Parenchymal hematoma	18.55 (5.71 to 26.06)	17.15 (7.23 to 29.45)	0.754
Symptomatic HT ‡	23,35 (15.07 to 29.59)	16.10 (7.02 to 28.13)	0.303
mRS >2 §	19.46 (6.75 to 36.18)	15.48 (7.19 to 22.32)	0.040*
Exitus, at 3 months	23.55 (14.57 to 35.95)	16.07 (6.89 to 27.07)	0.043*

OPN values are expressed as median (lower-upper quartile); * significant p-value < 0.05

¶ACE-I: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors; ¥ ARB: Angiotensin II Receptor Blockers
†TACI: Total Anterior Circulation Infarction; ‡ HT hemorrhagic transformation; § mRS: modified Rankin Scale. § In order to dichotomize age, we performed a ROC curve and chose 72 years as the best cut point to predict the functional status.

Supplemental-Table 3. Patients clinical characteristics considering long-term outcome by mRS §

Clinical Data	Baseline	mRS ≤ 2	mRS>2	p value
	n=178	n=58	n=72	
Age (mean ±SD)	71.8 ±13.3	66.6 ±14.4	75.86 ± 11.4	<0.0001*
Male % (n)	52.8% (94)	51.7% (30)	54.2% (39)	0.781
Smoking % (n)	15.2% (27)	23.2% (13)	13.6%(10)	0.170
Hypertension % (n)	62.9% (112)	56.9% (33)	66.7% (48)	0.253
Diabetes Mellitus % (n)	21.9% (39)	15.5% (9)	26.4% (19)	0.134
Hypercholesterolemia % (n)	33.7% (60)	27.6% (16)	33.3% (24)	0.448
Atrial Fibrillation % (n)	39.3% (70)	29.3% (17)	48.6% (35)	0.021*
Coronary disease% (n)	21.3% (38)	17.2% (10)	22.2% (16)	0.480
Previous Stroke % (n)	12.9% (23)	5.2% (3)	18.1% (13)	0.026*
Proximal occlusion % (n)	50.0% (89)	34.4% (20)	68.0% (49)	0.0001*
Atherothrombotic % (n)	18.6% (33)	8.6% (5)	27.8% (20)	0.006*
Cardioembolic % (n)	50.0% (89)	48.3% (28)	54.2% (32)	0,503
TACI † % (n)	79.1% (140)	74.1% (43)	91.7% (66)	0.007*
Glycemia, median (IQR)	120 (97 to 153)	106 (92 to 172)	128 (101 to 161)	0.181
Baseline NIHSS, median (IQR)	16 (4 to 23)	12(8 to17)	17(14 to 21)	<0.0001*
Neurological improvement %	59.9% (106)	87.9% (51)	37.5% (27)	<0.0001*
Neurological worsening % (n)	9% (16)	0% (0)	20.8% (15)	<0.0001*
Hemorrhagic transformation %	20.7% (37)	19.3% (11)	25.7% (18)	0.392
Parenchymal hematoma % (n)	8.4% (15)	5.3% (3)	12.9% (9)	0.146
Symptomatic HT ± % (n)	4.5% (8)	3.4% (2)	8.3% (6)	0.249
OPN level, ng/mL	16.9 (7.1 to 27.9)	15.4 (7.2 to22.3)	19.9 (6.7 to 36.1)	0.040*

*significant p-value < 0.05 (between good and bad prognosis groups); †TACI: Total Anterior Circulation Infarction; ‡ HT hemorrhagic transformation; § mRS: modified Rankin Scale

Figure 1. . **Study design.** Study design for recruitment of stroke patients for OPN assessment. POCI: posterior circulation infarction. DTC: Doppler Transcranial.

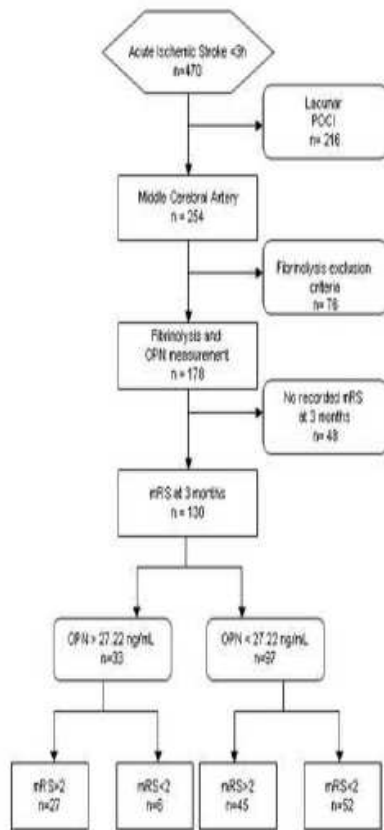


Figure 2. Functional outcome regarding OPN level. Bars show the proportion of functional long-term prognosis by mRS scale regarding level of serum OPN (ng/mL).

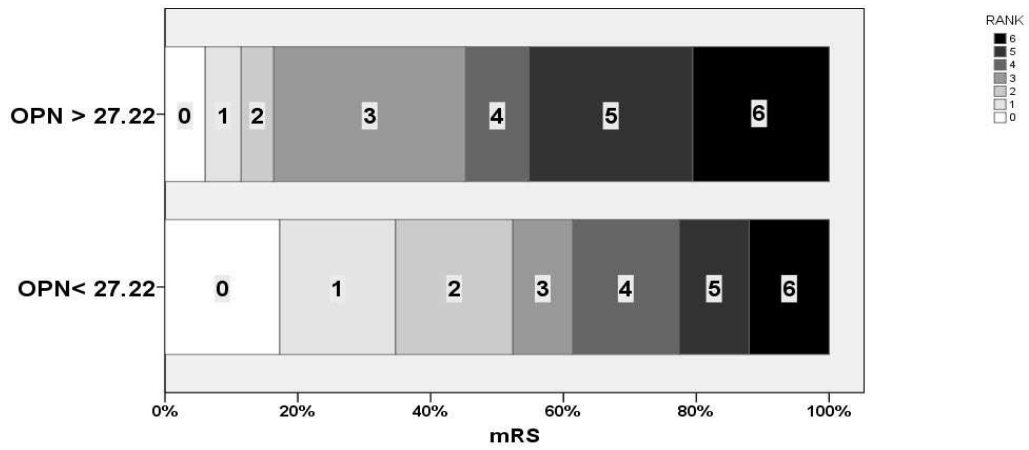
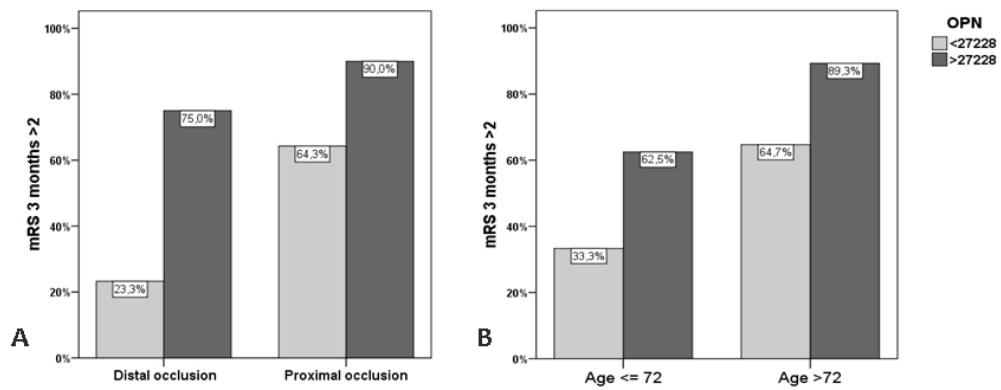


Figure 3. Bad outcome prediction considering OPN level, vessel occlusion location and age. Long-term bad outcome prediction among tPA-treated patients according to the combination of independent variables in the logistic regression model. A. OPN and vessel occlusion location. B. OPN and age. A ROC curve was configured to select the best cut point of OPN that predicts the bad functional outcome (mRS>2).



3,7 BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE PREDICTS WORSENING AND MORTALITY IN ACUTE STROKE PATIENTS. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.

Brain Natriuretic Peptide predicts worsening and mortality in acute stroke patients.

Montaner J, Mendioroz M, Palacios M, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Maisterra O, Molina CA, Rosell A, Alvarez-Sabín J.

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

ABSTRACT Background and Objective- Although the prognostic role of natriuretic peptides has been studied in heart failure and coronary diseases, value of BNP is less known in stroke. Therefore, we aimed to study the relationship between plasma levels of BNP with acute neurological worsening and mortality after stroke. **Methods-** Consecutive stroke patients (ischemic and hemorrhagic) admitted to the Stroke Unit of a University Hospital attended within 24h of symptoms onset were included. Stroke severity was assessed according to the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission and at discharge. Neurological worsening was defined as an increase of 4 or more points in the NIHSS score or death during the stay of the patient at the Stroke Unit. Blood samples were drawn at arrival to measure plasma levels of BNP (Biosite Inc, San Diego). **Results-** 886 patients were included in the study. BNP plasma level was higher among patients who later on worsened (n=112; 91.9 vs 61.9 ng/L, p=0.006) or died (n=83; 128 vs 61.7 ng/L, p<0.001). In fact, multivariate logistic regression analysis confirmed that plasma BNP level was an independent predictor of neurological worsening (BNP>56.7 ng/L OR= 1.79) and death after stroke (BNP>65.35 ng/L OR: 2.27), together with other well known predictors of bad outcome. **Conclusions-** Plasma level of BNP measured during the acute phase of stroke seems useful as a prognostic marker both for early neurological worsening and mortality.

Brain natriuretic peptide (BNP) was originally identified in brain but nowadays it has been shown to be synthesized mainly in cardiac tissue as a result of myocyte stretch (1). The prognostic role of natriuretic peptides has been studied in heart failure, coronary diseases and also among general population to predict risk of death and cardiovascular events (2, 3). However, among stroke patients the prognosis value of BNP has been less studied. Recently, Mäkikallio et al. demonstrated a relationship between natriuretic peptides and long term mortality after a first ischemic stroke in a small series of 51 cases (4) and Shibasaki et al showed BNP relationship with in-hospital mortality after acute ischemic stroke (5). In our study we have included a very large number of patients with ischemic and also hemorrhagic stroke to establish the relationship between plasma levels of BNP with acute neurological worsening and mortality after stroke.

Methods

Patients and protocol

During a two years period a prospective study was carried in 886 consecutive stroke

patients (ischemic and hemorrhagic) admitted to the Stroke Unit of a University Hospital during the first 24 hours after symptoms onset.

Stroke severity was assessed in each patient according to the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission and at discharge. Neurological worsening was defined as an increase of 4 or more points in the NIHSS score or death during the stay of the patient at the Stroke Unit. Risk factors for stroke and stroke subtypes were taken into account.

Laboratory data

Blood samples were drawn at emergency department arrival in EDTA tubes centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and plasma frozen at -80°C until analysis. Blood testing was performed before any treatments were administered to avoid drug-biomarker interference. Plasma levels of BNP were measured by means of ELISA technique following manufacturer instructions (Biosite Inc, San Diego).

Statistics

Data was analyzed using the SPSS 12.0 software. Univariate analysis was performed with the appropriated test. BNP cut-off level for prediction of both worsening and mortality was established using a Receiver Operator Characteristics (ROC) curve. Multivariate logistic regression analysis was applied to variables that differentiated worsening and mortality to establish their individual predictive value. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated for each variable.

Results

Of the 886 included patients 48% were female, with mean age of 72 (SD12) years, 23% had a previous stroke, 13.4% had ischemic heart disease, 23.3% atrial fibrillation, and 57.3% were hypertensive and 26.3% diabetics. 84.6% were ischemic strokes and the remaining were hemorrhagic strokes.

BNP plasma level was higher among patients who later on worsened ($n=112$; 91.9 vs 61.9 ng/L, $p=0.006$) or died ($n=83$; 128 vs 61.7 ng/L, $p<0.001$) as also shown in Figure. Multivariate logistic regression analysis confirmed that plasma BNP level was an independent predictor of neurological worsening (BNP>56.7 ng/L OR= 1.79) and death after stroke (BNP>65.35 ng/L OR: 2.27) as shown in the Table.

Other predictors of bad outcome were previous stroke, stroke severity (baseline NIHSS), intracranial hemorrhage, diabetes mellitus and atrial fibrillation.

Discussion

Our study demonstrates that plasma BNP level is an independent prognostic factor for early mortality and what it is more important a newly defined factor for neurological worsening after an acute stroke. BNP increase has been associated with the intensity of brain ischemia reflecting the magnitude of brain injury (4, 6). On the other hand, an acute blood pressure elevation has been well-documented during acute phase of stroke, and this might increase BNP releasing

from the heart since BNP play a role in the hemodynamic regulation during this period (7). Since high BNP level might reflect severe brain damage and produce disturbances in the autonomic cardiovascular system its role worsening the prognosis seems feasible.

Regarding mortality, our results are in accordance with findings by Jensen (8) and also Makikallio (4) that reported higher levels of natriuretic peptides among patients who died after 6 months of stroke or within a 4-years follow-up respectively; and further extend those results to the acute phase of stroke, confirming the results by Shibasaki et al (5). Interestingly we also confirm that the prognostic value of BNP is not only useful in ischemic but also in hemorrhagic stroke as pointed by others (9) and extend those findings to the acute phase of brain bleedings.

Other reports have not been able to show the relationship between NT-proBNP and 3 months mortality (10), although NT-proBNP shows a significant influence on the outcome in the univariate analysis. This effect was outweighed if other important predictors of outcome such as initial NIHSS and lesion volume were taken into account. Our data shows prognostic value for BNP across all the span of NIHSS scores (see Figure).

However some methodological differences of our work with previous studies need to be taken into account, since in those studies NT-proBNP instead of BNP was used. Although both BNP and NT-proBNP assays have near-identical test performance in ruling out severely reduced left ventricular ejection fraction and in prediction of all-cause mortality or heart failure (11), direct comparisons of both biomarkers have not yet been done in the stroke field. Another limitation is that our study was designed to use this marker as a short-term prognostic tool, without differentiating stroke subtypes or medical conditions that might also affect BNP plasma level. Therefore in the future more detailed studies would address this issue to translate our results to clinical practice.

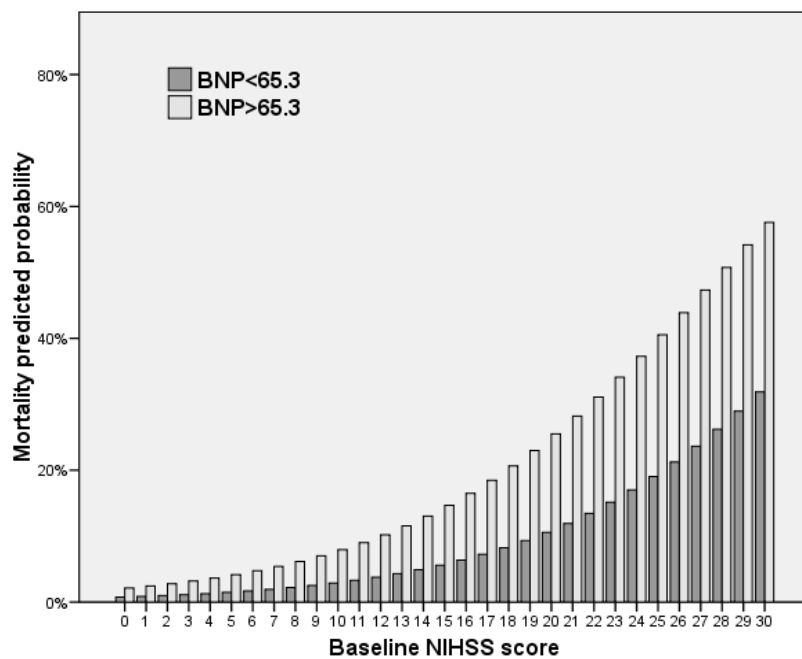
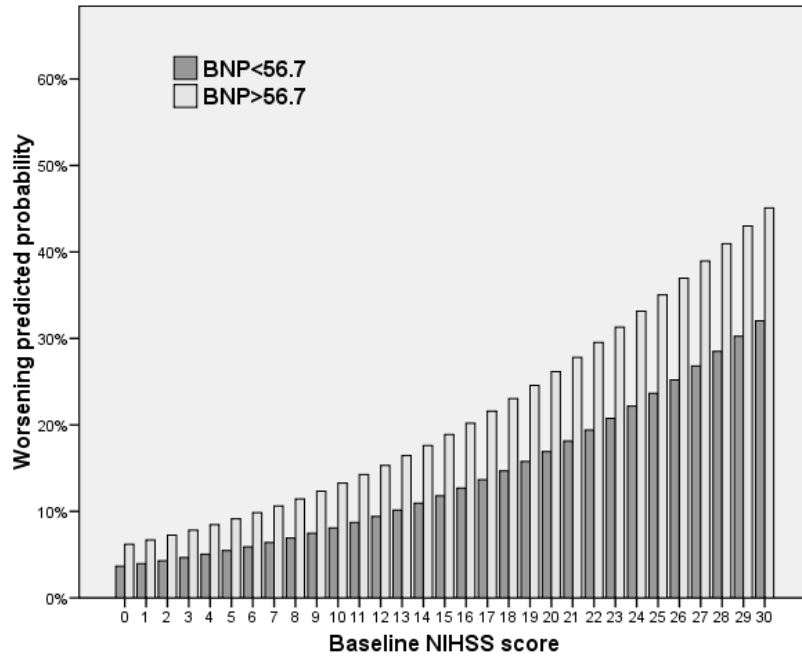
With our data it may be concluded that plasma level of BNP measured during the acute phase of stroke seems useful as a prognostic marker both for early neurological worsening and mortality, when values are above 56.7ng/L and 65.35ng/L respectively. To have very early information about the prognosis of a stroke patient might influence the choice of acute treatments having an impact on outcome. Therefore we recommend evaluating prognostic usefulness of BNP rapid measurements in the acute setting among stroke patients.

References

1. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998; 339:321-328.
2. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet.* 2003; 362:316-322.
3. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med.* 2004; 350:655-663.
4. Mäkikallio AM, Mäkikallio TH, Koperlainen JT, Voulteenahe O, Tapanainen JM, Ylitalo K, Sotaniemi KA, Huikuri HV, Myllylä VV. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke.* 2005; 36:1016-1020.
5. Shibazaki K, Kimura K, Okada Y, Iguchi Y, Uemura J, Terasawa Y, Aoki J. Plasma brain natriuretic peptide as an independent predictor of in-hospital mortality after acute ischemic stroke. *Intern Med.* 2009;48:1601-1606.
6. Nogami M, Shiga J, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. *Histochem J.* 2001;33:87-90.
7. Nakagawa K, Yamaguchi T, Seida M, et al. Plasma concentrations of brain natriuretic peptides in patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 19:157-164.
8. Jensen JK, Mickley H, Bak S, Korsholm L, Kristensen SR. Serial measurements of N-terminal pro-brain natriuretic peptide after acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006;22:439-444.
9. James ML, Blessing R, Phillips-Bute BG, Bennett E, Laskowitz DT. S100B and brain natriuretic peptide predict functional neurological outcome after intracerebral haemorrhage. *Biomarkers.* 2009;14:388-394.
10. Etgen T, Baum H, Sander K, Sander D. Cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in acute ischemic stroke do not relate to clinical prognosis. *Stroke.* 2005;36:270-275.
11. Richards M, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, Frampton CM, Crozier IG, Yandle TG, Doughty R, MacMahon S, Sharpe N; Christchurch Cardioendocrine Research Group; Australia-New Zealand Heart Failure Group. Comparison of B-type natriuretic peptides for assessment of cardiac function and prognosis in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:52-60.

Figure 1. Relation between plasma level of BNP and rates of patients with neurological worsening and mortality across all the span of NIHSS scores for both ischemic (A) and hemorrhagic stroke patients (B).

A Ischemic Stroke



B Hemorrhagic Stroke

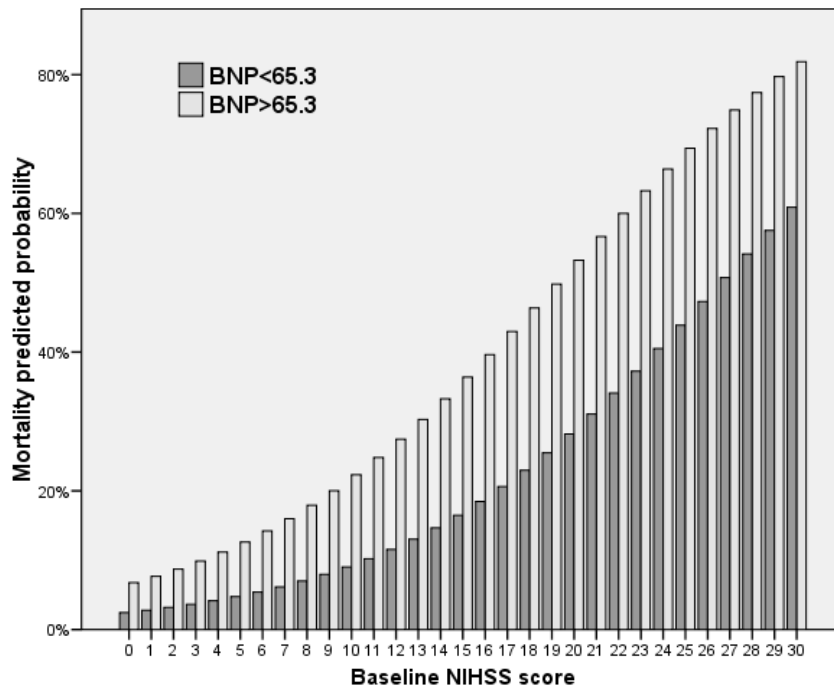
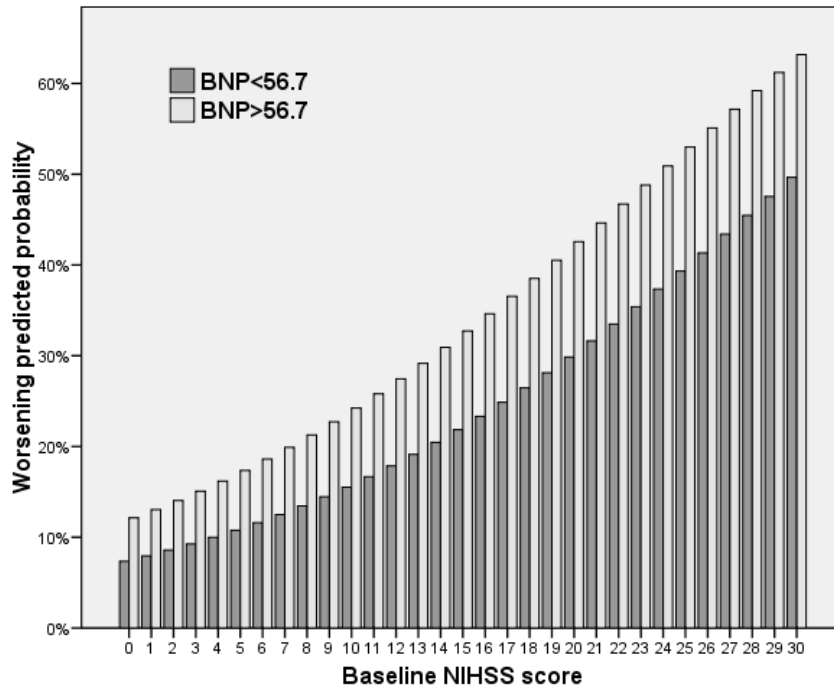


Table 1.

Multivariate logistic regression analysis for bad outcome after stroke.

	<i>Worsening</i> n=112			<i>Mortality</i> n=83	
	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)		<i>p</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)
BNP > 56.7 ng/L	0.016	1.799 (1.114-2.903)	BNP > 65.35 ng/L	0.013	2.276 (1.190-4.354)
Previous Stroke	0.034	1.755 (1.045-2.948)	Previous Stroke	0.020	2.142 (1.126-4.075)
Diabetes Mellitus	0.033	1.688 (1.044-2.729)	Atrial Fibrillation	0.003	2.540 (1.362-4.736)
Baseline NIHSS	<0.001	1.088 (1.054-1.122)	Baseline NIHSS	<0.001	1.142 (1.095-1.190)
ICH	0.002	2.320 (1.359-3.961)	ICH	<0.001	4.409 (2.327-8.356)

ICH: Intracranial Haemorrhage.

4. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En esta tesis se demuestra que la determinación de biomarcadores plasmáticos podría ser útil en el diagnóstico, manejo y pronóstico de los pacientes con enfermedad cerebrovascular aguda.

El primer trabajo publicado constituye una revisión bibliográfica acerca de los diferentes biomarcadores estudiados, tanto en modelos experimentales animales como en humanos, en relación al ictus isquémico. En dicha revisión se resalta además la relevancia que los biomarcadores pueden tener en el diagnóstico, clasificación etiológica, manejo y pronóstico del ictus. Se comenta el avance tecnológico que permitirá en el futuro la identificación de nuevos biomarcadores de un modo más rápido y preciso. En los siguientes artículos que constituyen el cuerpo de la tesis se describen marcadores biológicos que, en los pacientes con ictus agudo, hemos identificado y relacionado con el diagnóstico de ictus isquémico, la respuesta al tratamiento fibrinolítico, en cuanto a la eficacia y seguridad del fármaco, y el pronóstico funcional de los pacientes.

TABLAS RESUMEN DE RESULTADOS

“RESULTADOS-BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DEL ICTUS”

ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL	BIOMARCADOR CANDIDATO	ASOCIACIÓN	MEDIDA DE LA ASOCIACIÓN (regresión logística)	MEDIDA DE LA PREDICCIÓN (área bajo la curva)
Caspasa 3 /Dímero D	n=1005 Ictus vs. mimics	Panel biomarcadores <24h; <6h; <3h	ICTUS <24h	Caspasa-3 >1,96 ng/mL OR 3,32 (IC95% 1,88-5,88) p=0,001	AUC 0,759 (IC95% 0,699-0,820)
				DD>0,27 ug/ml OR 2,97(IC95% 1,72-5,16) p=0,0001	
			ICTUS <6h		
			ICTUS <3h		AUC=0,797 (IC95%0,736-0,857)
S100B/RAGE	n=915 Ictus isquémico vs. hemorrágico	Panel biomarcadores <24h; <6h; <3h	ICTUS HEMORRÁGICO <3h	S100B > 96 pg/mL OR 5,02 (IC95% 1,88-13,42) p< 0,001	AUC 0,807 (IC95%0,725-0,881)
				RAGE < 0,97 ng/mL OR 0,11 (IC95% 0,03-0,36) p<0,001	
			ICTUS HEMORRÁGICO <6h	S100B > 96 pg/mL OR 3,97 (IC95% 1,82-8,68) p<0,001	
	RAGE < 0,97 ng/mL OR 0,22 (IC95% 0,10-0,52) p<0,001				
			ICTUS HEMORRÁGICO <24h	S100B > 96 pg/mL OR 2,89 (IC95% 1,8-4,65) p<0,001	AUC 0,767 (IC95% 0,719-0,8)
				RAGE < 0,97 ng/mL OR 0,46 (IC95% 0,29-0,74) p< 0,001	

“RESULTADOS-BIOMARCADORES EN EL TRATAMIENTO DEL ICTUS”

ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL	BIOMARCADOR CANDIDATO	ASOCIACIÓN	MEDIDA DE LA ASOCIACIÓN (regresión logística)	FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS
APC	n=119 Ictus isquémico-ACM; rt-PA	APC basal; 1h-2h-12h-24h	Transformación Hemorrágica (PH) (11,1%)	APC-2h >176% OR 25,19 (IC95% 4,76-133,19) p=0,01	
			Mortalidad (16,2%)	APC-2h >157% OR 13,8 (IC95% 2,58-73,63) P=0,001	Edad>77a OR 1,13 (IC95% 1,02-1,26) p=0,017
TAT	n=89 Ictus isquémico-ACM; rt-PA	TAT basal	Recanalización completa 1h (11%)	TAT <24 µg/L OR 24,8 (IC95% 1,4-434,8) p=0,028	
			Recanalización completa 2h (24,3%)	TAT <24 µg/L OR 6,3 (IC95% 1,5-27,0) p=0,014	HTA OR 0,19 (IC95% 0,044-0,84) p=0,028
			Recanalización completa 6 h (33,8%)	TAT <24 µg/L OR 6,4 (IC95% 1,5-26,5) p=0,011	Sexo masculino OR 7,9 (IC95% 1,54-40,3) p=0,013

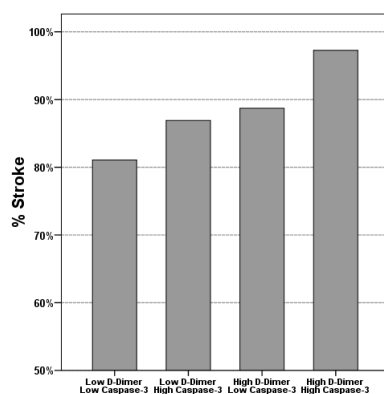
“RESULTADOS- BIOMARCADORES EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS”

ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL	BIOMARCAD OR CANDIDATO	ASOCIACIÓN	MEDIDA DE LA ASOCIACIÓN (regresión logística)	FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS
OPN	n=178 Ictus isquémico-ACM; rt-PA	OPN basal	mRS>2 al tercer mes (55,3%)	OPN >27,22 ng/mL OR 5,01 (IC95% 1,60-15,72) p=0,006	Ictus aterotrombótico OR 4,68 (IC95% 1,25-17,54) P=0,022
					Edad OR 1,04 (IC95% 1,00-1,08) p=0,051
BNP	n= 886 Ictus	BNP basal	Empeoramiento neurológico (12,6%)	BNP>56,7 ng/L OR 1,81 (IC95% 1,14-2,90)	Oclusión proximal OR 5,53 (IC95% 2,12-14,43) p=0,0004
			Mortalidad (9,3%)	BNP>65,35 ng/L OR 2,28 (IC95% 1,19-4,35)	Ictus previo, NIHSS basal, ictus hemorrágico, DM, ACFA

4.1 CASPASA 3, DÍMERO D, S100B Y sRAGE EN EL DIAGNÓSTICO DEL ICTUS

El diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular aguda todavía se basa, hoy en día, en la evaluación clínica del paciente con el apoyo de las pruebas de neuroimagen, que fundamentalmente sirven para descartar procesos que simulan la aparición de un ictus. Puesto que no disponemos de pruebas que confirmen la presencia de la enfermedad cerebrovascular, el grado de error en el diagnóstico es elevado. Entre los pacientes que reciben el diagnóstico de ictus agudo tras ser evaluados por un neurólogo experto en enfermedades vasculares en un hospital terciario encontramos un 9,8% de mimics. Esta proporción asciende al 19-31% cuando la evaluación se realiza en otros niveles de atención sanitaria (Libman et al., 1996; Hand, 2006). Sin embargo, el diagnóstico de ictus debe alcanzarse de una forma precisa y rápida, puesto que la administración del tratamiento trombolítico en un centro adecuado no puede demorarse más de las primeras 4,5 horas tras el inicio de los síntomas y el resto de medidas terapéuticas deben iniciarse también de forma precoz. Es por esto que los biomarcadores que ayuden a realizar el diagnóstico de ictus, especialmente en las primeras horas tras el inicio de los síntomas, serían de una gran utilidad. En los últimos años se ha propuesto que la utilización de un panel de biomarcadores mejoraría el rendimiento de estas pruebas (Reynolds et al., 2003; Laskowitz et al., 2009), respecto a la determinación de biomarcadores aislados. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado un panel válido para su uso en la práctica clínica.

En el segundo trabajo de esta tesis presentamos un panel de biomarcadores que resulta útil en la diferenciación entre ictus y mimics, especialmente en las primeras 3-6 horas tras el inicio de los síntomas. La combinación de 6 biomarcadores, incluyendo caspasa 3, dímero D (DD), sRAGE, secretagogina, chimerina y MMP-9, muestra una probabilidad del 99,01% de predecir el ictus isquémico cuando está presente la mejor combinación de estos biomarcadores. En este estudio, la asociación óptima de biomarcadores ha resultado ser la combinación de caspasa 3 y de DD, como muestra la siguiente figura.



Probabilidad de diagnóstico de ictus en función de la combinación de caspasa 3 y DD.

La caspasa 3 es una proteasa efectora de la apoptosis celular, proceso que ocurre en el parénquima cerebral isquémico, especialmente en las zonas de penumbra, junto con los mecanismos celulares habituales de necrosis (Hou et al., 2002; Love et al., 2000). También se ha visto aumentada la expresión de caspasa 3 en las áreas perihematoma en pacientes que fallecían tras sufrir un ictus hemorrágico (Wu et al., 2006). Su contribución a la extensión del daño isquémico se ha demostrado en modelos experimentales, puesto que los ratones deficientes para la caspasa 3 presentan un volumen de infarto menor tras la isquemia cerebral, mientras que los ratones que sobreexpresan la caspasa 3 desarrollan infartos de mayor tamaño que los ratones no deficientes (Le et al., 2002; Kerr et al., 2004). Además, en trabajos previos, nuestro grupo ya observó que los niveles plasmáticos de caspasa 3 se elevan en las primeras 24 horas tras el ictus y que los niveles elevados de caspasa 3 en plasma, determinados a las 24 horas del inicio de los síntomas, se relacionan con el crecimiento del infarto, medido en las secuencias de difusión de la RM, y con un peor pronóstico del paciente (Rosell et al., 2008).

Es interesante señalar que un gran número de estudios que han tratado de identificar biomarcadores para el diagnóstico del ictus han partido de la comparación de pacientes con individuos sanos. En este contexto, es muy poco probable que un biomarcador aporte más información que la que podemos obtener de la valoración clínica, puesto que el diagnóstico no plantea problemas. El verdadero punto conflictivo es, sin duda, el correcto diagnóstico de pacientes que presentan una disfunción neurológica focal brusca, que

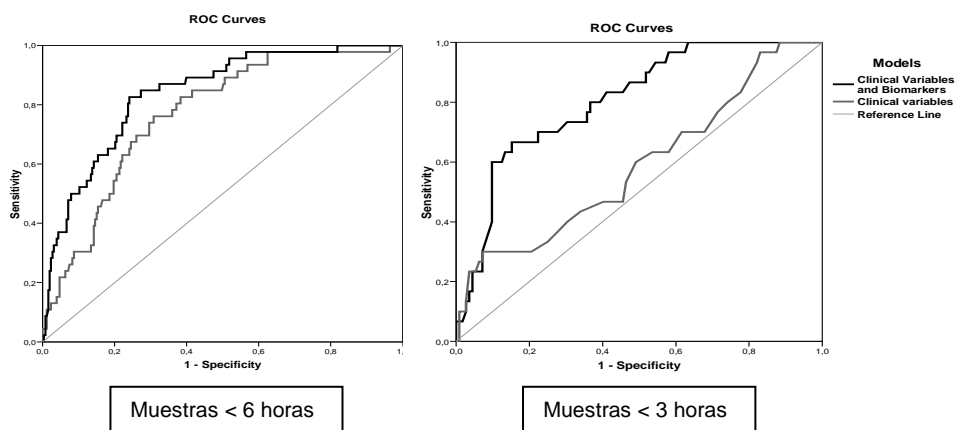
puede ser debida a un ictus o a bien a otras enfermedades que lo simulan, como una crisis epiléptica, el aura migrañosa, un brote de esclerosis múltiple, el estado confusional agudo o un tumor cerebral, entre otros. En este sentido, nuestro estudio ha sido diseñado para diferenciar los pacientes con ictus de los mimics. Además, un elemento de gran valor en nuestro trabajo es la amplia población estudiada, de 1005 pacientes, que ha permitido reclutar un grupo también amplio de 90 mimics. Sin embargo, es conveniente remarcar que el porcentaje relativo de estos mimics puede variar entre los diferentes hospitales y también entre los diferentes niveles sanitarios. Por este motivo, nuestros resultados deberían validarse en un amplio estudio multicéntrico y probablemente, en diferentes niveles de la asistencia sanitaria antes de considerar su aplicación clínica.

Por otro lado, cabe reseñar que estas moléculas no son completamente específicas del proceso de isquemia cerebral y, en última instancia, desconocemos cuál es la fuente de estos biomarcadores. Por ejemplo, en el caso de la caspasa 3, esta puede proceder de neuronas o células gliales que inician procesos de apoptosis y alcanzaría la circulación periférica tras producirse una disrupción de la BHE, o bien puede provenir directamente de las células de la serie blanca o roja circulantes que experimenten procesos de apoptosis.

Otro paso importante en el diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular es la diferenciación entre la naturaleza isquémica o hemorrágica del ictus, que en la actualidad se basa en la realización de un estudio de neuroimagen, generalmente con TC. Conviene recordar que el acceso a esta prueba es sencillo en centros de tercer nivel, pero puede resultar más lento cuando se atiende al paciente en hospitales comarcales de ciertas áreas o en otros ámbitos sanitarios. Además, la diferenciación rápida y precisa entre ictus hemorrágicos e isquémicos sería de especial interés en la fase prehospitalaria, puesto que permitiría instaurar de forma inmediata medidas específicas de tratamiento, como el descenso farmacológico de la presión arterial en los pacientes con ictus hemorrágicos, durante el traslado del paciente al hospital. Así mismo, permitiría alertar al equipo que recibirá al

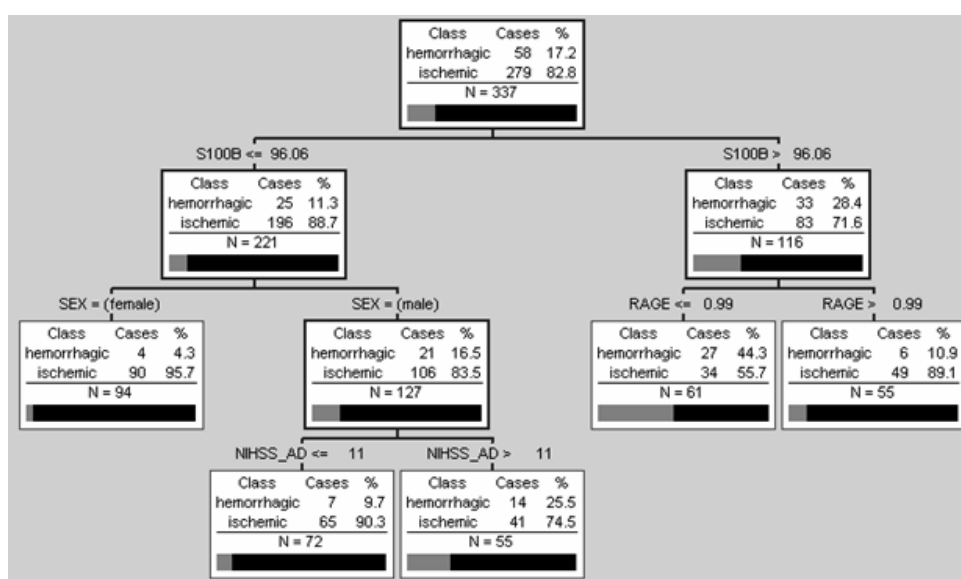
paciente en urgencias para que pongan en marcha los diferentes protocolos de actuación.

En cuanto a este problema diagnóstico, en el tercer trabajo presentado en la presente tesis, se muestra cómo la combinación de dos biomarcadores, S100B y sRAGE sirve para diferenciar a los pacientes con ictus hemorrágico de los pacientes con ictus isquémico. Los niveles elevados de S100B (>96 pg/mL) y bajos de sRAGE ($<0,97$ ng/mL) se asocian de forma independiente con el ictus hemorrágico en un modelo de regresión logística y la combinación de estas moléculas y los datos clínicos que predicen la hemorragia mejora el rendimiento del modelo predictivo clínico, pasando el área bajo la curva ROC (AUC) de 0,768 (IC95% 0,701-0,836) a 0,839 (IC95% 0,781-0,896) cuando se analizan de forma global todos los pacientes del estudio. Por otro lado, aunque los mejores resultados predictivos se obtienen cuando se analizan los biomarcadores en las primeras 6 horas de iniciado el ictus (AUC= 0,839; IC95% 0,781-0,896), la determinación de S100B y sRAGE en las primeras 3 horas también permite desarrollar un modelo predictivo de suficiente precisión (AUC=0,807; IC95% 0,725-0,881) y que incrementa de forma significativa la capacidad predictiva de los datos clínicos (AUC=0,589; IC95% 0,471-0,708) en esa ventana temporal inicial ($p= 0,003$ para la comparación del AUC de ambas curvas).



La figura muestra la mejoría de la capacidad predictiva del modelo para el ictus hemorrágico cuando se añaden los biomarcadores S100B y sRAGE a las variables clínicas.

En este estudio utilizamos de forma complementaria en el análisis estadístico el método CART, que evita algunos de los problemas que presenta la regresión logística y además presenta los resultados en forma de árbol, lo que facilita en gran medida la interpretación del resultado. Es destacable que los puntos de corte obtenidos por el método CART fueron casi superponibles a los que utilizamos siguiendo el análisis tradicional y que el área bajo la curva ROC asociada al árbol CART fue semejante a las que encontramos para los modelos de regresión logística.



La figura muestra el resultado del método CART para la clasificación de los pacientes en función de los biomarcadores medidos en las 6 primeras horas tras el inicio del ictus y los factores clínicos para diferenciar los ictus isquémicos de los hemorrágicos

En nuestro estudio un punto destacable es que gran parte de las determinaciones de los biomarcadores pudieron realizarse en las primeras horas (3-6h) tras el inicio de los síntomas, que es precisamente el marco temporal en el que resultaría más útil el panel de biomarcadores.

Un test para diferenciar la naturaleza isquémica o hemorrágica del ictus puede utilizarse en diferentes contextos clínicos. Por ejemplo, si lo empleásemos para decidir la administración del tratamiento trombolítico en ausencia de otros datos de soporte, necesitaríamos una sensibilidad del 100% para el diagnóstico del ictus hemorrágico o una especificidad del 100% para el diagnóstico de ictus isquémico, puesto que las consecuencias de la

administración de rt-PA en el caso de la hemorragia intracerebral serían graves. Del mismo modo, en el contexto prehospitalario, la utilización de este test para iniciar otras medidas de tratamiento y soporte durante el traslado del paciente al hospital, como el descenso de la presión arterial en la hemorragia intracerebral necesitaría una alta especificidad para el ictus hemorrágico. Puesto que este es el comportamiento de la determinación combinada de S100B y sRAGE, creemos que la combinación de estas dos moléculas puede ser de especial utilidad en este último contexto clínico.

Una limitación de este estudio es que S100B no es un marcador completamente específico de hemorragia cerebral puesto que también se ha descrito que, tras el ictus isquémico, se produce una elevación en el nivel plasmático de S100B, con un pico máximo a las 48 horas (Missler et al., 1997). Precisamente este retraso en el incremento de S100B tras el ictus isquémico respecto a la rápida elevación en el ictus hemorrágico nos permite utilizarlo en la diferenciación de ambos subtipos de ictus en las primeras horas tras el inicio de los síntomas. En el caso de la hemorragia cerebral, el incremento más precoz de S100B se debe probablemente a la brusca ruptura de la BHE que facilita el paso de proteínas desde el parénquima cerebral al torrente sanguíneo. En este sentido es interesante remarcar que, gran parte de las moléculas que se han encontrado como potenciales biomarcadores en la hemorragia intracerebral parecen proceder de la astrogliosis, como es el caso de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Foerch et al., 2006) o de la misma S100B. Una posible explicación sería que estas células son especialmente abundantes en la sustancia blanca cerebral, región que se ve afectada de forma preferencial en la mayoría de los ictus hemorrágicos. Puesto que gran parte de las hemorragias cerebrales son de etiología hipertensiva y, por tanto, asientan en zonas profundas del encéfalo, la sustancia blanca se ve generalmente afectada de forma extensa. Además, S100B se ha postulado como un posible marcador del daño de la BHE, lo cual parece suceder de forma más temprana en el ictus hemorrágico respecto al isquémico.

4.2 LA TROMBINA Y LA PROTEINA C ACTIVADA EN EL MANEJO TERAPÉUTICO DEL ICTUS ISQUÉMICO

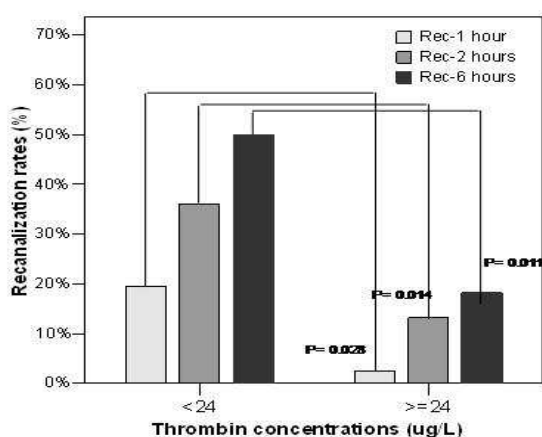
En la actualidad el único tratamiento aprobado en la fase aguda del ictus isquémico es el rt-PA (alteplase), el cual sólo puede administrarse en una ventana temporal muy estrecha de 4,5 horas (Adams et al., 2007; Hacke et al., 2008). Sin embargo, a pesar del beneficio terapéutico que aporta el tPA (NNT=7 para evitar una muerte o dependencia) (Wardlaw et al., 2003), en el 40% de los pacientes no se consigue la recanalización de la arteria a pesar de haberse administrado de forma correcta (Molina et al., 2004). En este contexto, la utilización de biomarcadores para predecir la resistencia al tratamiento fibrinolítico y la seguridad del mismo podría ayudar a ajustar la dosis del fármaco para incrementar su eficacia. Por otro lado, la principal limitación del uso del rt-PA está determinada por la aparición de una transformación hemorrágica (TH) de la zona infartada o incluso de una hemorragia a distancia que, cuando es sintomática, conlleva un deterioro neurológico del paciente, condicionando el estado funcional e incluso la mortalidad del paciente. La frecuencia de aparición de TH sintomática varía entre los diferentes estudios publicados y así, en el estudio observacional SITS-MOST se encontró en un 1,7% de los pacientes en las primeras 24 horas (Wahlgren et al., 2007), mientras que en los ensayos clínicos se ha descrito un porcentaje de TH entre un 6,4% del estudio NINDS y el 19,8% del ECASS I (Hacke et al., 1995). Es probable que estas diferencias en la frecuencia de las complicaciones hemorrágicas sintomáticas puedan deberse, en gran parte, a las diferentes definiciones que se han considerado en los distintos estudios para la TH.

Aunque varios factores clínicos y radiológicos se han relacionado con la aparición de TH tras el tratamiento trombolítico, como por ejemplo la gravedad del ictus, la edad avanzada, la diabetes, el nivel de glucemia o bien la extensión de la lesión o del edema en la TC inicial (Demchuck et al., 1999; Khatri et al., 2007; Bang et al., 2007; Martí-Fàbregas et al., 2007), estos factores predictores todavía no se han incorporado a la toma de decisiones en el manejo terapéutico del ictus agudo. La detección de biomarcadores que ayuden a predecir esta temida complicación ayudaría a seleccionar mejor los

pacientes subsidiarios de recibir el rt-PA, evitando su administración a los pacientes con riesgo de sangrado, o incluso podría, en algunos casos, ampliar la ventana terapéutica del fibrinolítico. En este contexto necesitaríamos un test con una elevada especificidad para la TH sintomática, con el objetivo de evitar que pacientes susceptibles de ser tratados sean excluidos del tratamiento.

En relación a la eficacia del rt-PA, en el cuarto trabajo presentado en esta tesis, encontramos que los niveles, previos al tratamiento, del complejo trombina-antitrombina (TAT) por debajo de 24 $\mu\text{g/L}$, se asocian con una mayor proporción de recanalización arterial completa, medida 1 hora (OR=24,8 IC95% 1,4–434,8; $p=0,028$), 2 horas (OR=6,3 IC95% 1,5–27; $p=0,014$) y 6 horas (OR=6,4 IC95% 1,5–26,5; $p=0,011$) tras el inicio del tratamiento. Por el contrario, no se encontró asociación entre la concentración de TAT y las complicaciones hemorrágicas.

Figure 1



La figura muestra la concentración del complejo TAT ($\mu\text{g/L}$) en relación a la proporción de recanalización completa en los diferentes tiempos tras la infusión del rt-PA.

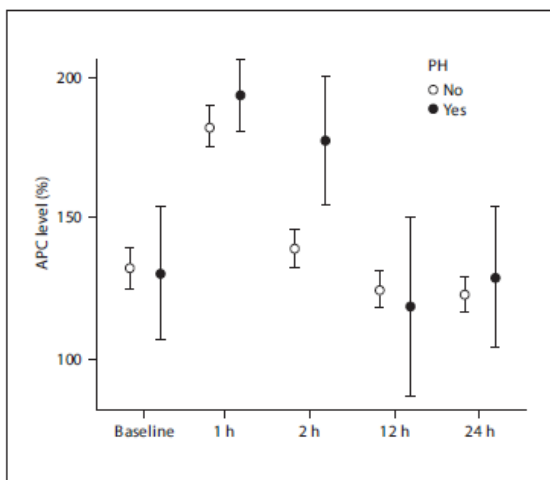
El complejo TAT es una medida indirecta de la concentración plasmática de trombina, que es considerada la enzima central de la cascada de la coagulación. La trombina ejerce efectos opuestos y así, es clave en la regulación del balance coagulación/anticoagulación en el organismo. Previamente se había descrito una relación entre los niveles elevados de TAT a

las 24 horas de iniciarse el tratamiento fibrinolítico y una mayor mortalidad al tercer mes tras el ictus (Tanne et al., 2006). Nuestro estudio apoya que el mecanismo implicado en la mayor mortalidad de los pacientes con niveles elevados de TAT podría ser la resistencia a la recanalización del vaso y no el incremento de las complicaciones hemorrágicas. Además, es bien conocido que la resistencia a la recanalización del vaso se asocia a un peor pronóstico neurológico (Molina et al., 2001). Sin embargo, cabe destacar que en nuestra serie, a diferencia del estudio de Tanne y colaboradores, los niveles de TAT se midieron antes del tratamiento y no se relacionaron con la mortalidad al tercer mes, aunque sí observamos una tendencia, presentando el doble de mortalidad los pacientes con TAT > 24 µg/L (23,3%) respecto a los pacientes con niveles de TAT < 24 µg/L (14,3%). Es posible que nuestro menor tamaño muestral (n=89) respecto al del estudio de Tanne y colaboradores (n=465) no permitiera encontrar diferencias estadísticamente significativas en cuanto al pronóstico. De hecho, sería extremadamente difícil encontrarlas puesto que, considerando los niveles de TAT que observamos en nuestra serie, asumiendo un valor de significación de 0,05 y una potencia estadística del 80%, calculamos que sería necesario un tamaño muestral de 330 pacientes que fallecieran comparados con un grupo de 330 pacientes que sobrevivieran, para encontrar diferencias estadísticamente significativas.

El uso de biomarcadores como el complejo TAT podría guiar la estrategia del tratamiento en la fase aguda, especialmente en esta época en la que las técnicas intervencionistas, como la administración de rt-PA intra-arterial o la utilización de dispositivos para realizar una trombectomía mecánica, se están investigando e implementado cada vez más. De esta forma, la determinación de biomarcadores que predigan la falta de respuesta a la fibrinólisis intravenosa, podría incorporarse en el diseño de protocolos de actuación dirigidos a una rápida intervención intravascular en los pacientes no respondedores.

En cuanto a la seguridad del tratamiento fibrinolítico, en el quinto trabajo expuesto en esta tesis, encontramos que la concentración de la proteína C activada (APC) se relaciona con las complicaciones hemorrágicas y la

mortalidad tras el tratamiento con rt-PA. Así, a las 2 horas de iniciado el tratamiento, los niveles de APC>176% predicen la TH parenquimatosa (OR=25,19 IC95% 4,76-133,19; p=0,0001) mientras que los niveles de APC>157% predicen la mortalidad (OR=13,8 IC95% 2,58-73,63; p =0,001) en un modelo de regresión logística.



La figura muestra el perfil temporal de la APC en función de la presencia de hematoma parenquimatoso tras el tratamiento fibrinolítico. Los pacientes que sufren esta complicación hemorrágica muestran un pico más elevado y sostenido de APC entre 1-2 horas tras el inicio del tratamiento.

La APC es una serín proteasa plasmática que, además de ejercer una acción anticoagulante, tiene una función anti-inflamatoria, anti-apoptótica y de protección de la BHE (Mosnier et al., 2007). En modelos animales se ha demostrado que la APC, cuando se administra junto con el rt-PA, reduce el efecto tóxico del fibrinolítico sobre las neuronas y la transformación hemorrágica mediada por el rt-PA (Liu et al., 2004; Cheng et al., 2006). Por ello se ha propuesto que la APC recombinante puede ser un tratamiento eficaz en el ictus isquémico agudo (Griffin et al., 2006) y ya está en marcha un estudio en fase II, el Activated Protein C in Acute Stroke Trial (APCAST) para determinar su eficacia y seguridad. Sin embargo, puesto que la APC es una proteína con acción anticoagulante, los pacientes con ictus isquémico tratados con este fármaco podrían sufrir complicaciones hemorrágicas. De hecho, la APC recombinante ya se utiliza para el tratamiento de la sepsis aguda y en los ensayos clínicos en este contexto se observó una mayor incidencia de

complicaciones hemorrágicas en los pacientes tratados con APC respecto a los tratados con placebo (2,1 vs. 0,7%) (Bernard et al., 2001). En nuestro estudio comprobamos que existe una relación independiente entre el nivel elevado de APC endógena a las 2 horas de la administración del rt-PA y la aparición de transformación hemorrágica y creemos que este resultado debería aumentar la cautela en la utilización combinada de APC y rt-PA en los pacientes con ictus isquémico.

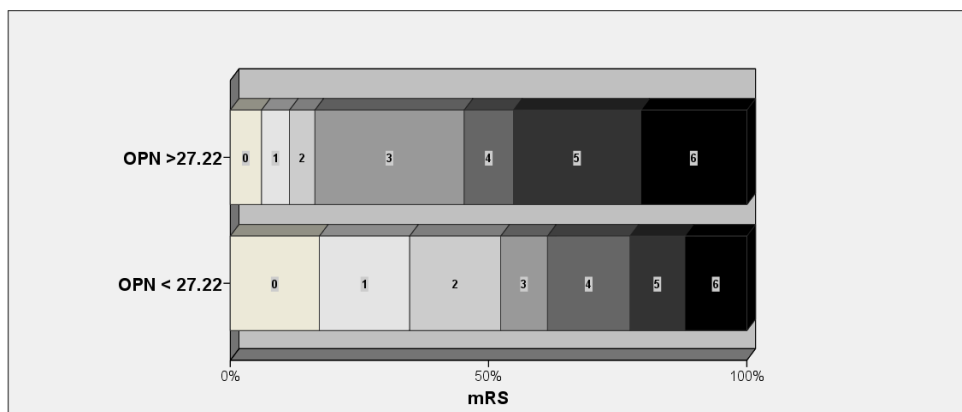
Por otra parte, el hecho de no encontrar relación entre los niveles basales de APC y la TH o la mortalidad, limita la capacidad de la APC como biomarcador capaz de guiar la decisión del tratamiento trombolítico. Su utilidad puede radicar más en la monitorización del paciente, puesto que la detección de APC elevada tras el tratamiento ayudaría a ejercer un control más estrecho de aquellos pacientes que muestren niveles de riesgo de complicaciones hemorrágicas o mortalidad.

En general podemos afirmar que la información aportada por el complejo TAT o APC como biomarcadores podría ayudar a guiar el tratamiento fibrinolítico y/o la monitorización posterior de los pacientes tratados. Así, serían de gran utilidad el detectar cuanto antes aquellos pacientes que responderán desfavorablemente al tratamiento fibrinolítico intravenoso y en los que se podría instaurar un tratamiento intervencionista (fibrinólisis intra-arterial o trombectomía mecánica) de una forma más precoz. Por otro lado, sería interesante estudiar la información que aportaría el uso combinado de estos dos biomarcadores en una serie de nuevos pacientes, puesto que esta combinación podría ayudar a establecer la individualización de la dosis del rt-PA, que en la actualidad se administra a todos los pacientes de forma estándar en función exclusivamente del peso corporal. La individualización de la dosis en función de factores biológicos permitiría quizá ampliar la eficacia del fármaco, puesto que, por una parte, el porcentaje de pacientes a los que se administraría rt-PA aumentaría al disminuir la incertidumbre respecto a los efectos secundarios y, por otra parte, podríamos incrementar de una forma segura la dosis en pacientes con resistencia al fármaco.

4.3 LA OSTEOPONTINA Y EL BNP EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS ISQUÉMICO

A pesar de los avances experimentados en los últimos años, el ictus sigue presentando un mal pronóstico vital y funcional (Lloyd-Jones et al., 2009). Sin embargo, en la práctica clínica habitual todavía es difícil establecer un pronóstico preciso del paciente individual cuando la familia o el propio paciente lo solicitan. En los últimos años se han identificado factores clínicos o radiológicos asociados al pronóstico, como la edad avanzada, la presión sistólica elevada al ingreso, la diabetes, el tabaquismo, la gravedad del ictus, la fibrilación auricular o la leucoaraiosis extensa (Kissela et al., 2009; Armario et al., 2008; Eriksson et al., 2008) e incluso se han desarrollado modelos estadísticos para predecirlo (Counsell et al., 2002; Counsell et al., 2004). Esta información podría ayudar a estratificar el pronóstico cuando se plantea introducir al paciente en un ensayo clínico. No obstante, en la actualidad carecemos de pruebas que nos ayuden a establecer el pronóstico individual de un paciente en las primeras horas tras el inicio del ictus de forma que podamos utilizarlo para informar a los pacientes y familiares o guiar el manejo, por ejemplo a la hora de ingresar a un paciente en una unidad de ictus o en la planta de hospitalización, en una situación de recursos sanitarios limitados en la que no podemos ofrecer este servicio a la totalidad de los pacientes con ictus y, por tanto, es importante seleccionar a los que realmente se van a beneficiar de dicha intervención. Sin duda, este tipo de biomarcadores pueden ser muy útiles tanto para facilitar la inclusión de pacientes en determinados ensayos clínicos como en la toma de decisiones clínicas.

En el sexto trabajo de la tesis mostramos cómo OPN predice de forma independiente el pronóstico del paciente al tercer mes tras el ictus isquémico. En nuestra serie el 55,3% de los pacientes presentaron un mal pronóstico, evaluado como una puntuación en la mRS > 2, lo que está de acuerdo con los datos de otras series obtenidas de la literatura (Asplund et al., 1998). En este trabajo, el nivel basal de OPN > 27,22 ng/mL se asocia a un peor pronóstico (mRS > 2) al tercer mes tras ajustar por factores de riesgo el modelo de regresión logística (OR 5,01 IC95% 1,60-15,72, p=0,006).



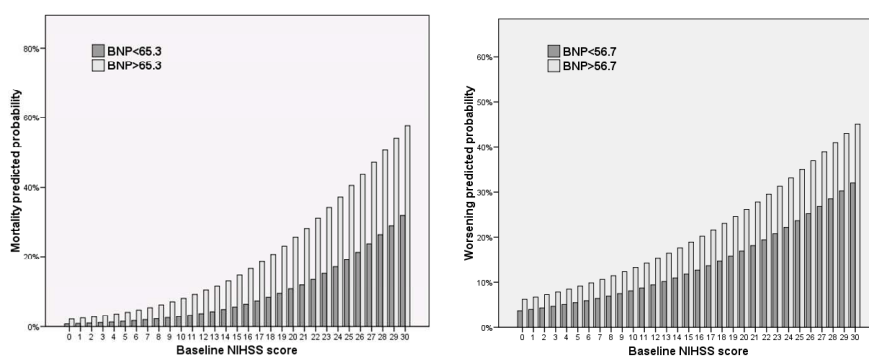
Pronóstico funcional determinado por la mRS en función de los niveles de OPN (ng/mL).

OPN es una proteína de la matriz extracelular que, además de inhibir la mineralización de los tejidos, participa en el desarrollo y mantenimiento de los procesos de inflamación crónica, incluidos los que dan lugar al desarrollo de la arteriosclerosis (Scatena et al., 2007; Giachelli et al., 1993). De forma congruente con este papel, en nuestra serie encontramos que los pacientes con una etiología aterotrombótica mostraban niveles más elevados de OPN que el resto de etiologías (19,31 vs. 14,86 ng/mL; $p=0,061$), aunque la diferencia no llegaba a ser estadísticamente significativa, probablemente debido al tamaño reducido del grupo de pacientes aterotrombóticos en nuestra serie ($n=34$). Lamentablemente, hemos calculado que necesitaríamos un tamaño muestral difícilmente asumible (4258 casos vs. 4258 controles), para encontrar diferencias estadísticamente significativas en este aspecto.

En esta tesis observamos que los niveles elevados de OPN se relacionan con un peor pronóstico, hecho que también sucede en el caso de otras moléculas proinflamatorias que han sido estudiadas como potenciales biomarcadores pronósticos en la enfermedad cerebrovascular. Así, los niveles elevados de la proteína C reactiva (PCR) predicen la mortalidad tras un primer ictus isquémico (Elkind et al., 2006) y también en los pacientes que reciben tratamiento fibrinolítico (Montaner et al., 2006). Sin embargo, el mecanismo que subyace y explica esta asociación se desconoce. En nuestra serie, OPN no se relacionó con la aparición de complicaciones hemorrágicas ni con la tasa de recanalización.

Por otra parte se ha observado, en estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, que OPN puede tener un papel neuroprotector en la isquemia cerebral (Meller et al., 2005; Doyle et al., 2008). Estas observaciones parecen contradecir nuestro hallazgo de niveles más elevados de OPN en los pacientes con un mal pronóstico funcional. Sin embargo, el nivel elevado de OPN podría producirse como un mecanismo protector y, sin embargo, insuficiente, ante la agresión producida por la isquemia. En esta línea, se han descrito previamente otras moléculas, como el receptor de la IL-1, que aún jugando un potencial papel neuroprotector en la isquemia cerebral, se encuentran elevadas en la fase aguda del ictus. Además, conviene tener presente que OPN es una proteína multifuncional y, en este sentido, es posible que *in vivo*, sus efectos deletéreos puedan superar a su función protectora. En este sentido, OPN sufre un procesamiento por la trombina y por diversas metaloproteinasas, dando lugar a péptidos que funcionalmente podrían perder su efecto citoprotector. En cualquier caso, es necesario continuar la investigación de esta molécula para determinar por qué se observa esta asociación.

Siguiendo esta línea, en el séptimo artículo presentado mostramos que el BNP tiene un papel pronóstico en los pacientes con ictus isquémico. En este estudio se observa que el nivel basal de BNP > 56,7 ng/L predice de forma independiente la mala evolución neurológica durante el ingreso, valorada como un incremento de 4 o más puntos en la escala NIHSS (OR=1,79; IC95% 1,11-2,90). Además, el nivel de BNP > 65,35 ng/L se asocia de forma independiente con la mortalidad tras el ictus (OR= 2,27; IC95% 1,19-4,35), añadiendo valor pronóstico a cada una de las puntuaciones de la escala NIHSS.



La figura muestra cómo el BNP aporta información predictiva en cuanto al pronóstico de mortalidad y empeoramiento del paciente durante la hospitalización para cada uno de las puntuaciones de la escala NIHSS.

El BNP es una proteína sintetizada principalmente en el ventrículo cardíaco, en situaciones de hipervolemia o de aumento de la presión arterial y que tiene un papel regulador de la homeostasis, aumentando la diuresis, la natriuresis y la dilatación periférica (Nakao et al., 1993). Previamente se había descrito que el BNP se eleva en el ictus (Nakagawa et al., 2005; Giannakoulas et al., 2005; Iltumur et al., 2006) y los niveles elevados se relacionan con un mayor grado de afectación neurológica y volumen del infarto (Tomita et al., 2008). Puesto que en la fase aguda del ictus se produce una elevación importante de la presión arterial, este podría ser el estímulo para el incremento de BNP plasmático, y su efecto, en último término hipotensor, podría dar cuenta del empeoramiento que sufren estos pacientes, puesto que el descenso de la presión arterial sistémica conlleva un empeoramiento de la perfusión cerebral (Wityk et al., 2006). En cuanto a la mortalidad, nuestros resultados están en consonancia con lo descrito por otros autores (Makikallio et al., 2005; Jensen et al., 2006; Shibasaki et al., 2009) que asocian el nivel elevado de BNP con la mortalidad intrahospitalaria, a los 6 meses y 4 años tras el ictus. La importancia de nuestro estudio radica en que se ha realizado en una amplia serie de pacientes (n=886) comparado con las otras series publicadas, cuya tamaño muestral no superaba los 335 pacientes y, además, se han incluido ictus hemorrágicos. Una limitación de nuestro estudio sería que no se hemos considerado en el análisis algunas de las condiciones médicas que pueden influir en el nivel del BNP, como puede ser la presencia de insuficiencia renal.

EL FUTURO DE LOS BIOMARCADORES EN EL ICTUS

El descubrimiento y aplicación de biomarcadores plasmáticos en el ictus isquémico sería de gran utilidad en el manejo de esta enfermedad. Sin embargo, este proceso presenta algunas dificultades. Para empezar, la investigación de estas moléculas está limitada por la especial naturaleza del sistema nervioso. A diferencia de lo que sucede en otros tejidos, la existencia de la BHE retrasa la liberación de las proteínas del parénquima cerebral al torrente sanguíneo, lo cual dificulta el aislamiento en sangre periférica de moléculas que procedan del tejido isquémico, en las primeras horas tras el inicio de los síntomas. Por otra parte, algunos potenciales biomarcadores de isquemia cerebral pueden elevarse en otras situaciones que simulan la presentación de un ictus, y por tanto, su especificidad desciende. Además, aunque en general suele existir una relación entre la concentración/actividad del biomarcador y el tamaño o el grado de afectación neurológica del infarto, esto no siempre se correlaciona con el pronóstico del paciente, puesto que en ocasiones, infartos lacunares y, por tanto, de pequeño tamaño pueden afectar a determinadas regiones estratégicas e implicar un mal pronóstico funcional.

En general, en un futuro cercano, las nuevas tecnologías y disciplinas, como los arrays de expresión génica, la proteómica o la genómica, permitirán identificar nuevos biomarcadores en la enfermedad cerebrovascular. En esta tesis hemos realizado una aproximación de biomarcador candidato, mediante la cual se seleccionan previamente moléculas para las que existe una sospecha fundada en datos científicos previos de su posible implicación en los procesos que subyacen al ictus cerebral. Las nuevas técnicas masivas permiten, sin embargo, aislar nuevos biomarcadores sin tener una hipótesis previa y por tanto podrían aportar nueva información, que incluso puede aumentar el conocimiento sobre las vías patogénicas del ictus y contribuir al desarrollo de futuras dianas terapéuticas.

5. CONCLUSIONES

5.1 Diferentes moléculas implicadas en procesos que subyacen a la isquemia cerebral, como las relacionadas con la cascada de la coagulación, la inflamación, la apoptosis o el estrés oxidativo, se asocian con el diagnóstico del ictus, la respuesta al tratamiento fibrinolítico y el pronóstico. Sin embargo, todavía no se ha validado el uso de estas moléculas en la práctica clínica como biomarcadores del ictus.

5.2 La utilización de un panel de biomarcadores que incluya caspasa 3 y dímero D es una prueba útil en el diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular y su diferenciación de otras entidades que simulan un ictus en las primeras 24 horas tras el inicio de los síntomas.

5.3 La utilización de un panel de biomarcadores que incluya S100B y sRAGE es una prueba útil en la diferenciación de la naturaleza isquémica o hemorrágica del ictus en las primeras 24 horas y, especialmente, en las primeras 6 horas tras el inicio de los síntomas.

5.4 La determinación plasmática del complejo trombina-antitrombina (TAT) es una prueba útil para valorar la eficacia del tratamiento fibrinolítico, puesto que el nivel basal elevado de TAT se asocia de forma independiente con un mayor grado de recanalización arterial.

5.5 La determinación plasmática de la proteína C activada (APC) es una prueba útil para valorar la seguridad del tratamiento fibrinolítico, puesto que el nivel elevado de APC a las 2 horas tras el inicio del tratamiento se asocia de forma independiente con la aparición de hematomas parenquimatosos y la mortalidad.

5.6 La determinación plasmática de la osteopontina (OPN) y del péptido natriurético cerebral (BNP) es útil para valorar el pronóstico del ictus. El nivel basal elevado de OPN se asocia de forma independiente con el mal pronóstico, determinado por una puntuación en la escala mRS >2 y el nivel basal elevado de BNP se asocia de forma independiente con la mortalidad y el empeoramiento neurológico del enfermo durante el ingreso.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Abraha HD, Butterworth RJ, Bath PM, Wassif WS, Garthwaite J, Sherwood RA. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem* 1997;34:366–370.

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;24:35–41.

Adams HP Jr, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A et al.; American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council; Clinical Cardiology Council; Cardiovascular Radiology and Intervention Council; Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2007;38:1655-711.

Adams HP Jr, Effron MB, Torner J, Dávalos A, Frayne J, Teal P et al.; AbESTT-II Investigators. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke*. 2008;39:87-99.

Agnholt J, Kelsen J, Schack L, Hvas CL, Dahlerup JF, Sorensen ES. Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol*. 2007;65:453–460

Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem*. 2001;276:28261–28267.

Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS et al. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial doppler monitoring. *Stroke*. 2000;31:610-4.

Alexandrov AV, Burgin SW, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation*. 2001;103:2897–2902.

Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2004;351:2170 –2178.

Alexandrov AV. Ultrasound enhancement of fibrinolysis. *Stroke*. 2009;40:S107-10.

Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27:502-8.

Arden, K. C, Viars, C. S, Weiss, S, Argentin, S, Nemer, M: Localization of the human B-type natriuretic peptide precursor (NPPB) gene to chromosome 1p36. *Genomics* 26:385-389, 1995.

Armario P, Martín-Baranera M, Miguel Ceresuela L, Hernández Del Rey R, Iribarnegaray E, Pintado S et al. Blood pressure in the initial phase of acute ischaemic stroke: evolution and its role as an independent prognosis factor at discharge and after 3 months of follow-up. *Blood Press.* 2008;17:284-90.

Asahi M, Hoshimaru M, Uemura Y, Tokime T, Kojima M, Ohtsuka T et al. Expression of interleukin-1 beta converting enzyme gene family and bcl-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:11-18.

Asplund K, Stegmayr B, Peltonen M. From the twentieth to the twenty-first century: a public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Malden, Mass: Blackwell Science; 1998; 2:chap 64.

Laure Aurelian L. Cross talk of signaling and apoptotic cascades in the CNS: target for virus modulation. *Frontiers in Bioscience.* 2005;10: 2776-2787

Ay H, Benner T, Arsava EM, Furie KL, Singhal AB, Jensen MB, et al. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke.* 2007 Nov;38:2979-84

B

Bajzar L, Manuel R, Nesheim MR. Purification and characterisation of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995; 270: 14477-14473.

a)Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB: The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996; 88: 2093–2100.

b)Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603–16608.

Bak S, Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins. *Stroke.* 2002; 33: 769–774

Bang OY, Saver JL, Liebeskind DS, Starkman S, Villablanca P, Salamon N et al. Cholesterol level and symptomatic hemorrhagic transformation after ischemic stroke thrombolysis. *Neurology.* 2007;68:737-42.

Bar-Shavit R, Kahn A, Wilner GD, Fenton JW 2nd. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science* 1983;220:728–731.

Bar-Shavit R, Sabbah V, Lampugnani MG, Marchisio PC, Fenton JW 2nd, Vlodavsky I et al. An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J Cell Biol* 1991;112:335–344

Barber M, Langhorne P, Rumley A, Lowe GD, Stott DJ. Hemostatic function and progressing ischemic stroke: D-dimer predicts early clinical progression. *Stroke*. 2004;35:1421-5.

Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002;105:816–22.

Barrett Connor E, Khaw, KT. Diabetes mellitus: an independent risk factor for stroke? *Am J Epidemiol* 1988;128:116-123.

Bayless KJ, Meininger GA, Scholtz JM, Davis GE. Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. *J Cell Sci*. 1998;111:1165–1174.

Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995;37:800–4.

Becker RC. Biomarkers in atrial fibrillation: investigating biologic plausibility, cause, and effect. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19:71-75.

Berger C, Fiorelli M, Steiner T, Schäbitz WR, Bozzao L, Bluhmki E et al. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? *Stroke*. 2001;32:1330-5.

Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2002;105:2392–7.

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A et al.; Recombinant human protein C worldwide evaluation in severe sepsis (PROWESS) study group: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344: 699–709

Bevan S, Dichgans M, Gschwendtner A, Kühlenbäumer G, Ringelstein EB, Markus HS. Variation in the PDE4D gene and ischemic stroke risk: a systematic review and meta-analysis on 5200 cases and 6600 controls. *Stroke*. 2008;39:1966-71.

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 1997;96:2262– 71.

Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89-95.

Blanco M, Moro MA, Davalos A, Leira R, Castellanos M, Serena J et al. Increased plasma levels of 15-deoxyDelta prostaglandin J2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke* 2005;36:1189-94.

Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GYH. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:277-84.

Bose A, Henkes H, Alfke K, Reith W, Mayer TE, Berlis A et al.; Penumbra Phase 1 Stroke Trial Investigators. The Penumbra System: a mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:1409-13.

Bostom, Andrew G. Nonfasting Plasma Total Homocysteine Levels and Stroke Incidence in Elderly Persons: The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1999;131:352-355

Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke.* 1992;23, 221-223

Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993;143:1699-712.

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40:e331-9.

C

Calvin AD, Somers VK. Obstructive sleep apnea and risk of stroke: time for a trial. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6:90-1.

a) Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE et al. Prediction of myocardial infarction by N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and renin in subjects with cerebrovascular disease. *Circulation.* 2005;112:110-6.

b) Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE et al. Prediction of heart failure by amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in subjects with cerebrovascular disease. *SWHypertension.* 2005;45:69-74.

Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE et al. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting ischemic stroke in patients with cerebrovascular disease. *Arch. Neuro.* 2006;63: 60-65

Carloni S, Mazzoni E, Cimino M, De Simoni MG, Perego C, Scopa C et al. Simvastatin reduces caspase-3 activation and inflammatory markers induced by hypoxia-ischemia in the newborn rat. *Neurobiol Dis.* 2006;21:119-26.

Carlson I, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Brown LF. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest.* 1997;77:103–108.

Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol.* 2004;61:1652-61.

Casper ML, Nwaise IA, Croft JB, Nilasena DS. *Atlas of Stroke Hospitalizations Among Medicare Beneficiaries.* Atlanta, Ga: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2008.

Castellanos M, Castillo J, García MM, Leira R, Serena J, Chamorro A et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke* 2002;33:982–7.

Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J et al. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004;35:1671-76.

Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, Luby M, Butman JA, Demchuk AM et al. Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. *Lancet.* 2007;369:293-8.

Chen J, Jin K, Chen M, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg DA et al. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem.* 1997;69:232–245.

Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003;9:338-342.

Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z et al. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med.* 2006;12:1278-1285.

Christou I, Alexandrov AV, Burgin WS, Wojner AW, Felberg RA, Malkoff M et al. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial Doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31:1812–1816

Clark SR, McMahon CJ, Gueorguieva I, Rowland M, Scarth S, Georgiou R et al. Interleukin-1 receptor antagonist penetrates human brain at experimentally therapeutic concentrations. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:387-94.

Cocho D, Borrell M, Martí-Fàbregas J, Montaner J, Castellanos M, Bravo Y et al. Pretreatment hemostatic markers of symptomatic intracerebral hemorrhage in patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2006;37:996-9.

Counsell C, Dennis M, McDowall M, Warlow C. Predicting outcome after acute and subacute stroke: development and validation of new prognostic models. *Stroke*. 2002;33:1041-7.

Counsell C, Dennis M, McDowall M. Predicting functional outcome in acute stroke: comparison of a simple six variable model with other predictive systems and informal clinical prediction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:401-5.

Côté R, Wolfson C, Solymoss S, Mackey A, Leclerc JR, Simard D et al. Hemostatic markers in patients at risk of cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1856-62.

Comess KA, DeRook FA, Beach KW, Lytle NJ, Golby AJ, Albers GW. Transesophageal echocardiography and carotid ultrasound in patients with cerebral ischemia: prevalence of findings and recurrent stroke risk. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1598 –1603.

Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258–264.

Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol*. 2008;84:207-14.

Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellecchia M et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2005;25:10262–10272.

D

a)Daniels LB, Allison MA, Clopton P, Redwine L, Siecke N, Taylor K et al. Use of natriuretic peptides in pre-participation screening of college athletes. *Int J Cardiol* 2008;124:411-4.

b)Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2357-68.

Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:295-302.

Dávalos A, Castillo J, Alvarez-Sabín J, Secades JJ, Mercadal J, López S et al. Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke*. 2002;33:2850-7.

Delgado P, Alvarez Sabin J, Santamarina E, Molina CA, Quintana M, Rosell A et al. Plasma S100B level after acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2006;37:2837-9.

Demchuk AM, Morgenstern LB, Krieger DW, Linda Chi T, Hu W, Wein TH et al. Serum glucose level and diabetes predict tissue plasminogen activator-related intracerebral hemorrhage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:34-9.

Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD et al. Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2001; 32:89- 93

Di Cera E. Thrombin. *Mol Aspects Med*. 2008;29:203-54.

Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2007;6:149–161

Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 1991;6:575–581.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391–397

Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*. 1990; 343, 282–284

Domingues-Montanari S, Mendioroz M, del Rio-Espinola A, Fernández-Cadenas I, Montaner J. Genetics of stroke: a review of recent advances. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8:495-513.

Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, Del Río-Espinola A, Mendioroz M, Fernandez-Morales J, Corbeto N et al. KCNK17 genetic variants in ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2010;208:203-9.

Dominguez C, Delgado P, Vilches A, Martin-Gallan P, Ribó M, Santamarina E, Molina CA, Corbeto N, Rodriguez-Sureda V, Rosell A, Alvarez-Sabin J, Montaner J. Oxidative stress following thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke*, 2010 (en prensa).

Dominiczak AF, McBride MW. Genetics of common polygenic stroke. *Nat. Genet*. 2003;35:116–117.

Donato R: S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33: 637–668.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003;60:540-51.

Doyle KP, Yang T, Lessov NS, Ciesielski TM, Stevens SL, Simon RP et al. Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28: 1235-1248.

Dzialowski I, Pexman JH, Barber PA, Demchuk AM, Buchan AM, Hill MD; CASES Investigators. Asymptomatic hemorrhage after thrombolysis may not be benign: prognosis by hemorrhage type in the Canadian alteplase for stroke effectiveness study registry. *Stroke*. 2007;38:75-9.

E

Eckert B, Koch C, Thomalla G, Kucinski T, Grzyska U, Roether J et al. Aggressive therapy with intravenous abciximab and intra-arterial rtPA and additional PTA/stenting improves clinical outcome in acute vertebrobasilar occlusion: combined local fibrinolysis and intravenous abciximab in acute vertebrobasilar stroke treatment (FAST): results of a multicenter study. *Stroke*. 2005;36:1160-5.

Ellis MH, Kesler A, Friedman Z, Drucker I, Radnai Y, Kott E. Value of prothrombin fragment 1.2 (F 1.2) in the diagnosis of stroke in young patients with antiphospholipid antibodies. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2000;6:61-4.

Ellinor PT, Low AF, Patton KK, Shea MA, Macrae CA. Discordant atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide levels in lone atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:82– 6.

Ellison JA, Velier JJ, Spera P, Jonak ZL, Wang X, Barone FC et al. Osteopontin and its integrin receptor alpha(v) beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke*. 1998;29:1698 – 1706.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495–516.

Elting JW, de Jager AEJ, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J et al: Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci* 2000;181:104–110.

Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADPribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1143–1151.

Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T et al. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab*.1998;18:238 –247.

Efstathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, Gratsias YE, Pefanis AV, Mountokalakis TD. Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke*. 2005;36:1915-9.

Eriksson M, Norrving B, Terént A, Stegmayr B. Functional outcome 3 months after stroke predicts long-term survival. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25:423-9.

Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124:265-325.

Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 1989;170:1387–407.

Esposito G, Scuderi C, Lu J, Savani C, De Filippis D, Iuvone T et al. S100B induces tau protein hyperphosphorylation via Dickkopf-1 up-regulation and disrupts the Wnt pathway in human neural stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008;;12:914-27

F

Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1032–7.

Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4060–4066.

Feinberg WM, Bruck DC, Ring ME, Corrigan JJ Jr. Hemostatic markers in acute stroke. *Stroke.* 1989;20:592-7.

Feistritzer C, Riewald M: Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005;105: 3178–3184.

Fernández JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JH. Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30:271-276.

Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Rubiera M, Mendioroz M, Molina CA et al. Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1862-8.

Fernández-Cadenas I, Molina CA, Alvarez-Sabín J, Ribó M, Penalba A, Ortega-Torres L et al. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2006;398:167-71.

Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T et al. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1071–1076.

Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E et al. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke.* 1999;30:2280-4.

Fleury V, Lijnen HR, Angles Cano E. Mechanism of the enhanced intrinsic activity of single-chain urokinase-type plasminogen activator during ongoing fibrinolysis. *J Biol Chem.* 1993;268:18554-18559.

Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, et al. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004;35:2160-4.

Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol* 2005; 62: 1130-1134.

Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 181-184.

Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M et al. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke*. 2007;38:2491-5.

Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ, et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation*. 1999;100:736-742.

Franscini N, Bachli EB, Blau N, Leikauf MS, Schaffner A, Schoedon G. Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation*. 2004;110:2903-2909

G

García Berrocoso T, Mendioroz M. Biomarcadores de isquemia cerebral transitoria. En: *Ataque Isquémico Transitorio*. Montaner J. eds Marge medica books. (Barcelona) 2009

García-Moncó JC, Marrodán A, Foncea Beti N, Gómez Beldarrain M. Stroke and transient ischemic attack-mimicking conditions: a prospective analysis of risk factors and clinical profiles at a general hospital. *Neurologia*. 2002;17:355-60.

Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1393-400.

Gazzolo D, Bruschetti M, Lituania M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem*. 2001;47:1836-8.

Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Lituania M, Marras M, Bruschetti M et al. High maternal blood S100B concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and intraventricular hemorrhage. *Clin Chem*. 2006;52:819-26.

Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002;102:4751-4804.

Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1993; 92:1686 -1696.

Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM et al Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1994;45:515–524.

Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;760:109 –126.

Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000;19:615– 622.

Giannakoulas G, Hatzitolios A, Karvounis H, Koliakos G, Charitandi A, Dimitroulas T et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels are elevated in patients with acute ischemic stroke. *Angiology.* 2005;56:723-30.

Gidday JM, Gasche Y G, Copin J C, Shah A R, Perez R S, Shapiro S D et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 289:558-568

Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C et al. Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2007;27:655– 660.

González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabín J et al; Proyecto Ictus Research Group. Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke.* 2006;37:2288-93.

Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 1997;96:3063–3071.

Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, Manolescu A, Jonsdottir S, Jonsdottir T et al. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat. Genet.* 2003;35:131–138

Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, Styrkarsdottir U, Helgadottir A, Gschwendtner A et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2008;64:402-9.

Griffin JH. Blood coagulation. The thrombin paradox. *Nature* 1995;378:337–338

Griffin JH, Fernandez JA, Mosnier LO, Liu D, Cheng T, Guo H, et al: The promise of protein C. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 211–216

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

Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G et al. A sequence variant in ZFH3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet*. 2009;41:876-8.

Guo H, Singh I, Wang Y, Deane R, Barrett T, Fernández JA, et al. Neuroprotective activities of activated protein C mutant with reduced anticoagulant activity. *Eur J Neurosci*. 2009;29:1119-30.

H

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

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet*. 1998;352:1245-51.

Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M et al.; DIAS Study Group. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke*. 2005;36:66-73.

Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebich JB, Gruber F et al. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol*. 2009;8:141-50.

Hand PJ, Kwan J, Lindley RI, Dennis MS, Wardlaw JM. Distinguishing between stroke and mimic at the bedside: the brain attack study. *Stroke* 2006;37:769-75

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D et al.; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317-29.

Harbison J, Hossain O, Jenkinson D, Davis J, Louw SJ, Ford GA. Diagnostic accuracy of stroke referrals from primary care, emergency room physicians, and ambulance staff using the face arm speech test. *Stroke*. 2003;34:71-6.

Hassid BG, Nair MN, Ducruet AF, Otten ML, Komotar RJ, Pinsky DJ et al. Neuronal RAGE expression modulates severity of injury following transient focal cerebral ischemia. *J Clin Neurosci*. 2009;16:302-6.

Hata J, Matsuda K, Ninomiya T, Yonemoto K, Matsushita T, Ohnishi Y et al. Functional SNP in an Sp1-binding site of AGTRL1 gene is associated with susceptibility to brain infarction. *Hum Mol Genet*. 2007;16:630-9.

Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U et al. The gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat. Genet.* 2004;36:233–239

Higashi T, Sano H, Saishoji T, Ikeda K, Jinnouchi Y, Kanzaki T et al. The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 1997;46:463–72.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889–901.

Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995;270:25752–61.

Hornig CR, Bauer T, Simon C, Trittmacher S, Dorndorf W. Hemorrhagic transformation in cardioembolic cerebral infarction. *Stroke.* 1993;24:465-468.

Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I et al. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone.* 2004;34:37–47.

Hou ST, MacManus JP. Molecular mechanisms of cerebral ischemia induced neuronal death, *Int. Rev. Cytol.* 2002;221:93–148.

Hu YY, Dong XQ, Yu WH, Zhang ZY. Change in plasma S100B level after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Shock.* 2010;33:134-40.

Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble levels of receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:879–82.

I

Instituto Nacional de Estadística [sede Web]. Madrid: Sede central del Instituto Nacional de Estadística [acceso 6 de mayo de 2008]. Defunciones según la causa de muerte. Disponible en: http://www.ine.es/inebmenu/mnu_salud.htm.

Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med.* 2009;360:1718-28.

Ittumur K, Yavavli A, Apak I, Arıturk Z, Toprak N. Elevated plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in acute ischemic stroke. *Am Heart J.* 2006;151:1115-22.

Ishiguro Y, Kato K, Ito T, Nagaya M. Determination of 3 enolase isozymes and S-100 protein in various tumors in children. *Cancer Res* 1983; 43: 6080–6084.

Iwashima Y, Eto M, Hata A, Kaku K, Horiuchi S, Ushikubi F et al. Advanced glycation end products induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:368–80.

Iwanaga Y, Ueno M, Ueki M, Huang CL, Tomita S, Okamoto Y, et al. The expression of osteopontin is increased in vessels with blood-brain barrier impairment. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34:145-154.

Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res.* 2002;91:77– 82

J

Januzzi JL Jr., Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG et al. The N-terminal pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* 2005;95:948 – 54.

Janunger T, Nilsson-Ardnor S, Wiklund PG, Lindgren P, Escher SA, Lackovic K et al. A novel stroke locus identified in a northern Sweden pedigree: Linkage to chromosome 9q31-33. *Neurology.* 2009;73:1767-73.

Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke – the National Institute of Neurological Disorders and Stroke Recombinant Tissue Plasminogen Activator Stroke Study. *Stroke* 2006; 37: 2508–2513.

Jensen JK, Mickley H, Bak S, Korsholm L, Kristensen SR. Serial measurements of N-terminal pro-brain natriuretic peptide after acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006;22:439-444

Johnston SC, Rothwell PM, Nguyen-Huynh MN, Giles MF, Elkins JS, Bernstein AL et al. Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack. *Lancet.* 2007;369:283-92.

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of anti-thrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 11199–11203

Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral Hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol.* 1995;38:45-50.

K

Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D et al: Serum S-100 beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2002; 940: 102–104.

Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Taniguchi H, Arakawa K et al. High plasma levels of osteopontin in patients with stenosis after percutaneous coronary intervention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e1– e2.

Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Nakatani Y et al. Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 2005;28:2716–21

Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, Schuetz P, Zweifel C, Bingisser R et al. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2009;66:799-808.

Kataoka S, Hirose G, Hori A, Shirakawa T, Saigan T. Activation of thrombolysis and fibrinolysis following brain infarction. *J Neurol Sci.* 2000;181:82-8.

Katzan IL, Sila CA, Furlan AJ. Community use of intravenous tissue plasminogen activator for acute stroke: results of the brain matters stroke management survey. *Stroke.* 2001; 32: 861-5.

Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24:945-63.

Kelley-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2003;12:119-126.

Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke. The biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke* 2008;39:100-4.

Kerenyi L, Kardos L, Szász J, Szatmári S, Bereczki D, Hegedüs K et al. Factors influencing hemorrhagic transformation in ischemic stroke: a clinicopathological comparison. *Eur J Neurol.* 2006;13:1251-5.

Kerr LE, McGregor AL, Amet LE, Asada T, Spratt C, Allsopp TE et al. Mice overexpressing human caspase 3 appear phenotypically normal but exhibit increased apoptosis and larger lesion volumes in response to transient focal cerebral ischaemia. *Cell Death Differ.* 2004;11:1102-11.

Khatri P, Wechsler LR, Broderick JP. Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke.* 2007;38:431-40.

Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH. Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke.* 1993;24:1366-71.

Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:31740–9.

Kissela B, Lindsell CJ, Kleindorfer D, Alwell K, Moomaw CJ, Woo D et al. Clinical prediction of functional outcome after ischemic stroke: the surprising importance of periventricular white matter disease and race. *Stroke*. 2009;40:530-6.

Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9010-4.

Klungel OH, Kaplan RC, Heckbert SR, Smith NL, Lemaitre RN, Longstreth WT Jr et al. Control of blood pressure and risk of stroke among pharmacologically treated hypertensive patients. *Stroke*.2000;31:420-4.

Knudsen CW, Omland T, Clopton P, Westheim A, Wu AH, Duc P et al. Impact of atrial fibrillation on the diagnostic performance of B-type natriuretic peptide concentration in dyspneic patients: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:838-44.

Koenig MA, Puttgen HA, Prabhakaran V, Reich D, Stevens RD. B-type natriuretic peptide as a marker for heart failure in patients with acute stroke. *Intensive Care Med*. 2007;33:1587-93

Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH et al: Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85: 2756-2761.

Kostulas N, Pelidou SH, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1 β , IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke* 1999;30:2174-79.

Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2587-93.

Koyama H, Shoji T, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, Emoto M et al. Low circulating endogenous secretory receptor for AGEs predicts cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:147-53.

Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased expression of TGF- β 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1996;27:852-7.

Krupinski J, Lopez E, Marti E, Ferrer I. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2000;7:332-342.

Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano Tet al. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet*. 2007;39:212-7.

L

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 1997;272:17810–4.

Lane DA, Wolff S, Ireland H, Gawel M, Foadi M. Activation of coagulation and fibrinolytic systems following stroke. *Br J Haematol*. 1983;53:655-8.

Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-40.

Larrue V, von Kummer R R, Müller A, Bluhmki E. 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*. 2001;32:438-41.

Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann NY Acad Sci* 2005;1053:30.

Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke* 2009;40:77– 85.

Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009;119:480-6.

Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15188–15193.

Lee PN, Forey BA. Environmental tobacco smoke exposure and risk of stroke in nonsmokers: a review with meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2006;15:190-201.

Leya FS, Arab D, Joyal D, Leya FS, Arab D, Joyal D et al. The efficacy of brain natriuretic peptide levels in differentiating constrictive pericarditis from restrictive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1900–2.

Lewis SC, Sandercock PA, Dennis MS; SCOPE (Stroke Complications and Outcomes Prediction Engine) Collaborations. Predicting outcome in hyper-acute stroke: validation of a prognostic model in the Third International Stroke Trial (IST3). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:397-400.

Li DR, Michiue T, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Zhao D et al. Evaluation of postmortem S100B levels in the cerebrospinal fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)*. 2009;11:S273-5.

Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, deBlois D, Giachelli CM. Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:188–193.

Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest.* 1998;101:1468–1478.

Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke.* 2003;34:537–543

Libman RB, Wirkowski E, Alvir J, Rao TH. Conditions that mimic stroke in the emergency department. Implications for acute stroke trials. *Arch Neurol.* 1996;53:404

Lichtman JH, Watanabe E, Allen NB, Jones SB, Dostal J, Goldstein LB. Hospital arrival time and intravenous t-PA use in US Academic Medical Centers, 2001-2004. *Stroke.* 2009;40:3845-50.

Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X et al. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med.* 2004;10:1379-1383.

Loh KP, Huang SH, De Silva R, Tan BK, Zhu YZ. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3:327–337.

Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation.* 2009;119:1116-23.

Lorand L, Downey J, Gotoh T, Jacobsen A, Tokura S. The transpeptidase system which crosslinks fibrin by gamma-glutamyl-epsilon-lysine bonds. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;31:222–230.

Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke* 2001;32:2695–696.

Love S, Barber R, Wilcockn GK. Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*2000;26:55–66.

Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003;27:267–282.

Luepker RV, Arnett DK, Jacobs DR Jr, Duval SJ, Folsom AR, Armstrong C et al. Trends in blood pressure, hypertension control, and stroke mortality: the Minnesota Heart Survey. *Am J Med.* 2006;119:42–49.

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

Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann NY Acad Sci* 2005;1053:30.

M

Ma J, Endres M, Moskowitz MA. Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol.* 1998;124:756–762.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc PI. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161–7.

Mäkikallio AM, Mäkikallio TH, Korpelainen JT, Vuolteenaho O, Tapanainen JM, Ylitalo K et al. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke.* 2005;36:1016-20.

Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:17–25.

Martí-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 23:CD004388.

Martí-Fàbregas J, Borrell M, Cocho D, Belvís R, Castellanos M, Montaner J et al. Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA. *Neurology.* 2005;65:366-70.

Martí-Fàbregas J, Bravo Y, Cocho D, Martí-Vilalta JL, Díaz-Manera J, San Román L et al. Frequency and predictors of symptomatic intracerebral hemorrhage in patients with ischemic stroke treated with recombinant tissue plasminogen activator outside clinical trials. *Cerebrovasc Dis.* 2007;23:85-90.

Martí-Vilalta J.L, Arboix A. The Barcelona stroke registry. *Cerebrovas Dis* 1999;41:135-142.

Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 1999;19:3809–3817.

Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med.* 1998;338:1793-7.

Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol.* 2000;111:1223-9.

Matarín M, Brown WM, Scholz S, Simón-Sánchez J, Fung HC, Hernandez D et al. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol.* 2007;6:414–420.

Matsuda S, Umeda M, Uchida H, Kato H, Araki T. Alterations of oxidative stress markers and apoptosis markers in the striatum after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neural Transm* 2009;116:395-404.

McNeill A. How accurate are primary care referral letters for presumed acute stroke? *Scott Med J*. 2008;53:11-2.

Medrano Alberto MJ, Boix Martínez R, Cerrato Crespán E, Ramírez Santa-Pau M. Incidencia y prevalencia de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular en España: revisión sistemática de la literatura. *Rev Esp Salud Publica* 2006;80:5-15.

Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC et al. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1590–5.

Meller R, Stevens SL, Minami M, Cameron JA, King S, Rosenzweig H et al. Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25: 217-225.

Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*. 2004;19:151–167.

Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine. *Clin Chem*. 2002;48:2097-104.

Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Huertas Ret al. Time course of tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute cardioembolic stroke: a case-control study. *Stroke*. 2001;32:2821–2827.

Molina CA, Alexandrov AV, Demchuk AM, Saqqur M, Uchino K, Alvarez-Sabín J; CLOTBUST Investigators. Improving the predictive accuracy of recanalization on stroke outcome in patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2004;35:151-6.

Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2006;37:425– 429.

Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol* 2004;25:450-455.

Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001;32:1759-66.

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

Montaner J, Molina CA, Ribó M, Arenillas JF, Delgado P, Purroy F et al. Post-stroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:1.

Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke*. 2008;39:2280-7.

Moore BW: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;19: 739–744.

Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Morita E, Sumida H, Kato H et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:82–91.

Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J*. 2003;373:65-70.

Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004;104:740–1744.

Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007;109:3161-72.

Mouw G, Zechel JL, Zhou Y, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Caspase-9 inhibition after focal cerebral ischemia improves outcome following reversible focal ischemia. *Metab Brain Dis*. 2002;17:143–151.

Moe GW, Howlett J, Januzzi JL, Zowall H. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing improves the management of patients with suspected acute heart failure: primary results of the Canadian prospective randomized multicenter IMPROVE-CHF study. *Circulation* 2007;115:3103–10.

Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P et al. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med* 2004;350:647–54.

Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, Murikinati S, Yang H, Tracey KJ et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2008;28:12023-31.

Mvundura M, McGruder H, Khoury MJ, Valdez R, Yoon PW. Family History as a Risk Factor for Early-Onset Stroke/Transient Ischemic Attack among Adults in the United States. *Public Health Genomics*. 2009 Mar 23.

N

Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an “emergency” cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995;96:1280–7.

Nakagawa K, Yamaguchi T, Seida M, Yamada S, Imae S, Tanaka Y et al. Plasma concentrations of brain natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2005;19:157-64

Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, et al. Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23:368-71

Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992;10:1111-4.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-1587

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992;267:14998-5004.

Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty BW, O'Brien J et al. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood.* 2004;104:3878-3885

Nor AM, Davis J, Sen B, Shipsey D, Louw SJ, Dyker AG et al. The Recognition of Stroke in the Emergency Room (ROSIER) scale: development and validation of a stroke recognition instrument. *Lancet Neurol.* 2005;4:727-34.

O

Okada Y, Shibasaki K, Kimura K, Iguchi Y, Miki T. Brain natriuretic peptide as a predictor of delayed atrial fibrillation after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Eur J Neurol.* 2009 Oct 21.

Ogawa, Y, Itoh, H, Yoshitake, Y, Inoue, M, Yoshimasa, T, Serikawa, T et al. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics.* 1994;24:383-387.

Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2003;170:333-337.

Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, Umeshita-Sasai M, Mima T et al. Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1094-1101.

O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today.* 2000;21:475-478.

P

Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, Ageno W, Alberti A, Lanari A et al. Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke*. 2008;39:2249-56.

Park HY, Yun KH, Park DS. Levels of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Acute Ischemic Stroke without a Source of Cardioembolism. *J Clin Neurol*. 2009;5:126-32.

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998;4:1025–31

Parsons MW, Miteff F, Bateman GA, Spratt N, Loiselle A, Attia J et al. Acute ischemic stroke: imaging-guided tenecteplase treatment in an extended time window. *Neurology*. 2009;72:915-21.

Pelidou S-H, Kostulas N, Matusevicius D, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol* 1999;6:437–42.

Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13:271–289.

Pichiule P, Chavez JC, Schmidt AM, Vannucci SJ. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J Biol Chem*. 2007;282:36330-40.

Poncylyusz W, Falkowski A, Kojder I, Cebula E, Sagan L, Czechowski J et al. Treatment of acute ischemic brain infarction with the assistance of local intraarterial thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Acta Radiol*. 2007;48:774-80.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-703.

Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J* 2006;20:2565–6.

Q

Quinn TJ, Dawson J, Walters MR, Lees KR. Functional outcome measures in contemporary stroke trials. *Int J Stroke*. 2009;4:200-5.

R

Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis* 2006;189:193-7.

Rami A, Sims J, Botez G, Winckler J. Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2003;43:79–87.

Reddy MA, Li SL, Sahar S, Kim YS, Xu ZG, Lanting L et al. Key role of Src kinase in S100B induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2006;281:13685–93.

Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:976–82

Redondo, Elosúa, Marrugat, Epidemiología del ictus y sus factores de riesgo en España. Prevención del ictus isquémico. Joan Montaner. MARGE medica books. Barcelona. 1ª edición. 2008

Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol consumption and risk of stroke: a metaanalysis. *JAMA* 2003; 289: 579-88.

Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK, et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem* 2003;49:1733–1739.

(a) Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabín J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2004;91:1146-51.

(b) Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2004;35:2123-7.

Ribo M, Molina C, Montaner J, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Arenillas JF et al. Acute hyperglycemia state is associated with lower tPA-induced recanalization rates in stroke patients. *Stroke.* 2005;36:1705-9.

Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, MacMahon S, Sharpe N, Murphy J et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:1921–9

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science.* 2002;296:1880-1882.

Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:19808-19814.

Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* 1995;146:688–94.

Rodríguez-Yañez M, Castellanos M, Blanco M, Mosquera E, Castillo J. Vascular protection in brain ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2006;21 Suppl 2:21–29.

Rodríguez-Yañez M, Castellanos M, Blanco M, Millán M, Nombela F, Sobrino T et al. Micro- and macroalbuminuria predict hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology.* 2006;67:1172-7.

Rodríguez-Yañez M, Sobrino T, Blanco M, de la Ossa NP, Brea D, Rodríguez-González R et al. High serum levels of pro-brain natriuretic peptide (pro BNP) identify cardioembolic origin in undetermined stroke. *Dis Markers.* 2009;26:189-95.

Rosamond WD, Folsom AR, Chambless LE, Wang CH, McGovern PG, Howard G et al. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) cohort. *Stroke.* 1999;30:736–743.

Rosell A, Ortega A, Álvarez-Sabín J, Vilalta A, Fernández-Cadenas I, Ribó M et al. Sobreexpresión de metaloproteasa-9 en parénquima y microdializado cerebral tras el ictus isquémico y hemorrágico. *Neurología* 2005; 20:496

(a) 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;39:1121-26.

(b) Rosell A, Cuadrado E, Alvarez-Sabín J, Hernández-Guillamon M, Delgado P, Penalba A et al. Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2008;430:1-6.

Röther J, Schellinger PD, Gass A, Siebler M, Villringer A, Fiebach JB et al. Effect of intravenous thrombolysis on MRI parameters and functional outcome in acute stroke <6 hours. *Stroke.* 2002;33:2438-45.

Rudiger A, Gasser S, Fischler M, Hornemann T, von Eckardstein A, Maggiorini M. Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure. *Crit Care Med* 2006;34:2140–4.

S

Sacco RL. Risk factors, outcomes, and stroke subtypes for ischemic stroke. *Neurology* 1997; 49 Supl 4: 39-44.

Sairanen T, Carpén O, Karjalainen-Lindsberg M-L, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M et al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke* 2001;32:1750–58.

Salata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ. Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 1121–1125.

Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2302-9.

Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J. Tissuespecific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta* 2003;1630:1–6.

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992;267:14987–97.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108:949–55.

Schmidt AP, Tort AB, Amaral OB, Schmidt AP, Walz R, Vettorazzi-Stuckzynski J et al. Serum S100B in pregnancy-related hypertensive disorders: a case-control study. *Clin Chem.* 2004;50:435-8.

Schnabel R, Lubos E, Rupprecht HJ, Schnabel R, Lubos E, Rupprecht HJ et al. B-type natriuretic peptide and the risk of cardiovascular events and death in patients with stable angina: results from the AtheroGene study. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:552–8.

Schultz M, Faber J, Kistorp C, Jarlöv A, Pedersen F, Wiinberg N et al. N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) in different thyroid function states. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:54 –9.

Scott PA, Silbergleit R. Misdiagnosis of stroke in tissue plasminogen activator-treated patients: characteristics and outcomes. *Ann Emerg Med.* 2003 Nov;42:611-8.

Seidel G, Cangür H, Albers T, Burgemeister A, Meyer-Wiethe K. Sonographic evaluation of hemorrhagic transformation and arterial recanalization in acute hemispheric ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40:119-23.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos Sergiou A, Van de Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell.* 1994;5:565–574.

Shahar E, Struchalin M, Du Y, Glazer NL, Rosamond WD, Rivadeneira F et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med.* 2009;360:1718-28.

Shibazaki K, Kimura K, Okada Y, Iguchi Y, Uemura J, Terasawa Y et al. Plasma brain natriuretic peptide as an independent predictor of in-hospital mortality after acute ischemic stroke. *Intern Med.* 2009;48:1601-6.

Sienkiewicz-Jarosz H, Gałęcka-Wolska M, Bidziński A, Turzyńska D, Sobolewska A, Lipska B et al. Predictive value of selected biochemical markers of brain damage for functional outcome in ischaemic stroke patients. *Neurol Neurochir Pol.* 2009;43:126-33.

Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation*. 2001;103:1799-1805.

Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ*. 1989;298:789-94.

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF et al. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res*. 1997;3:605-611.

Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, Liebeskind DS et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke*. 2008;39:1205-12.

Sorimachi T, Fujii Y, Tsuchiya N, Nashimoto T, Harada A, Ito Y et al. Recanalization by mechanical embolus disruption during intra-arterial thrombolysis in the carotid territory. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25:1391-402.

Speer MY, McKee MD, Gulberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice:evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med*. 2002;196:1047-1055.

Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol*. 2004;26:179-184.

Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10212-10216

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C et al. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci* 2007;8:2.

Straub S, Junghans U, Jovanovic V, Wittsack HJ, Seitz RJ, Siebler M. Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2004;35:705-9.

Stroke Unit Trialists' Collaboration.Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD000197.

Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T et al. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1998;95:2337-2342.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004;1:17-25.

Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1732-39.

T

Takeda R, Suzuki E, Satonaka H, Oba S, Nishimatsu H, Omata M et al. Blockade of endogenous cytokines mitigates neointimal formation in obese Zucker rats. *Circulation* 2005;111:1398–406.

Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000;97:4239-4244.

Tan KC, Shiu SW, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:2756–62.

Tanne D, Macko RF, Lin Y, Tilley BC, Levine SR; NINDS rtPA Stroke Study Group. Hemostatic activation and outcome after recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2006;37:1798-1804.

Tapanainen JM, Lindgren KS, Makikallio TH, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Huikuri HV. Natriuretic peptides as predictors of non-sudden and sudden cardiac death after acute myocardial infarction in the beta-blocking era. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:757–63.

Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S et al. Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol* 1997;110:492–9.

Tejada J, Diez-Tejedor E, Hernandez-Echebarria L, Balboa O. Does a relationship exist between carotid stenosis and lacunar infarction? *Stroke* 2003;34:1404 –1411.

Thiyagarajan M, Fernández JA, Lane SM, Griffin JH, Zlokovic BV. Activated protein C promotes neovascularization and neurogenesis in postischemic brain via protease-activated receptor 1. *J Neurosci.* 2008;28:12788-97.

Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333:1581–1587.

Tollefsen DM. Heparin Cofactor II Modulates the Response to Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:454-60.

Tomita H, Metoki N, Saitoh G, Ashitate T, Echizen T, Katoh C et al. Elevated plasma brain natriuretic peptide levels independent of heart disease in acute ischemic stroke: correlation with stroke severity. *Hypertens Res.* 2008;31:1695-702.

Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sacchetti ML, Sette G, Argentino C et al. Hemorrhagic transformation of brain infarct: predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome. *Neurology*. 1996;46:341–345.

Truelsen T, Ekman M, Boysen G. Cost of stroke in Europe. *Eur J Neurol*. 2005; 12 Supl 1: 78-84.

Tsivgoulis G, Molina CA, Eggers J, Perren F, Rubiera M, Larrue V et al. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke*. 2008;39:593–594.

Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee S, Huang PL et al. Tissue Plasminogen Activator Promotes Matrix Metalloproteinase-9 Upregulation After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 2005;36:1954-59.

Tsutamoto T, Wada A, Sakai H, Ishikawa C, Tanaka T, Hayashi M et al. Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:582–6.

V

van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, Bootsma-van der Wiel A, Frölich M, Westendorp RGJ. Inflammation and stroke: the Leiden 85-plus study. *Stroke* 2002;33:1135–38.

Varga P, V Oláh A, Oláh E. Biochemical alterations in patients with Down syndrome. *Orv Hetil*. 2008;149:1203-13.

Vickery S, Price CP, John RI, Abbas NA, Webb MC, Kempson ME et al. B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. *Am J Kidney Dis* 2005;46:610–20.

W

Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W et al: Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007;369:275–282.

Wahlgren N, Ahmed N, Eriksson N, Aichner F, Bluhmki E, Dávalos A et al.; Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study Investigators. Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study (SITS-MOST). *Stroke*. 2008;39:3316-22.

Walther T, Stepan H, Pankow K, Gembardt F, Faber R, Schultheiss HP et al. Relation of ANP and BNP to their N-terminal fragments in fetal circulation: evidence for enhanced neutral endopeptidase activity and resistance of BNP to neutral endopeptidase in the fetus. *BJOG*. 2004;111:452-5.

Wang K, Zhou Z, Zhang M, Fan L, Forudi F, Zhou X et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma down-regulates receptor for advanced glycation end products and inhibits smooth muscle cell proliferation in a diabetic and nondiabetic rat carotid artery injury model. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:37–43.

Wang JY, Zhou DH, Li J, Zhang M, Deng J, Gao C et al. Association of soluble intercellular adhesion molecule 1 with neurological deterioration of ischemic stroke: The Chongqing Stroke Study. *Cerebrovasc Dis* 2006;21:67-73.

Wang TJ, Larson MG, Levy D, Leip EP, Benjamin EJ, Wilson PW et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol* 2002;90:254–8.

Wang Y, Thiyagarajan M, Chow N, Singh I, Guo H, Davis TP et al. Differential neuroprotection and risk for bleeding from activated protein C with varying degrees of anticoagulant activity. *Stroke*. 2009;40:1864-9.

Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 2003;9:1313-17.

Wardlaw JM, Zoppo G, Yamaguchi T, Berge E. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(3):CD000213.

Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1996;97:238–43.

Wendland MF, Faustino J, West T, Manabat C, Holtzman DM, Vexler ZS. Early diffusion-weighted MRI as a predictor of caspase-3 activation after hypoxic-ischemic insult in neonatal rodents. *Stroke*. 2008;39:1862-8.

Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009;40:e380-9.

Willemse JL, Brouns R, Heylen E, De Deyn PP, Hendriks DF. Carboxypeptidase U (TAF1a) activity is induced in vivo in ischemic stroke patients receiving thrombolytic therapy. *J Thromb Haemost* 2008;6:200-2.

Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*. 1978;272:549-550.

Wityk RJ, Lewin JJ 3rd. Blood pressure management during acute ischaemic stroke. *Expert Opin Pharmacother*. 2006;7:247-58.

Wolf PA, D'Agostino RB. Epidemiology of Stroke. En: Barnett M, Stein Y (Eds). *Stroke. Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 3rd ed. Churchill Livingstone, New York 1998;1:3-28.

Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 1994;93:1172–8.

Wong KY, McSwiggan S, Kennedy NS, MacWalter RS, Struthers AD. B-type natriuretic peptide identifies silent myocardial ischaemia in stroke survivors. *Heart*. 2006;92:487-9.

Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2004;227:49–53.

Y

Yamada Y, Fuku N, Tanaka M, Aoyagi Y, Sawabe M, Metoki N et al. Identification of CELSR1 as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study. *Atherosclerosis*. 2009;207:144-9.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685–91.

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003;370:1097–109.

Yang L, Bae JS, Manithody C, Rezaie AR. Identification of a specific exosite on activated protein C for interaction with protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 2007; 282: 25493–25500

Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90:195–203.

Yepes M, Lawrence DA. New functions for an old enzyme: nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp boil Med*. 2004;229:1097-1104.

Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S et al. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem*. 1999;274:36328 –36334.

Yokota C, Minematsu K, Tomii Y, Naganuma M, Ito A, Nagasawa H et al. Low levels of plasma soluble receptor for advanced glycation end products are associated with severe leukoaraiosis in acute stroke patients. *J Neurol Sci*. 2009;287:41-4.

Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;87:464–9.

Z

Zhong Y, Li SH, Liu SM, Szmitko PE, He XQ, Fedak PW et al. C-reactive protein upregulates receptor for advanced glycation end products expression in human endothelial cells. *Hypertension* 2006;48:504–11.

Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F et al. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation* 2003;107:2238–43.

ANEXO 1. Versión española simplificada de la escala de ictus NIHSS*

NIVEL DE CONCIENCIA	Alerta. Somnoliento. Estuporoso. Coma.	0 1 2 3	___
PREGUNTAS LOC	Responde ambas correctamente. Responde una correctamente. Incorrecto.	0 1 2	___
ORDENES LOC	Realiza ambas correctamente. Realiza una correctamente. Incorrecto.	0 1 2	___
MIRADA	Normal. Parálisis parcial de la mirada. Desviación oculocefálica.	0 1 2	___
CAMPOS VISUALES	Sin déficits campimétricos. Cuadrantanopsia. Hemianopsia homónima. Hemianopsia homónima bilateral, ceguera.	0 1 2 3	___
PARALISIS FACIAL	Movimientos normales y simétricos Paresia ligera. Parálisis parcial. Parálisis completa.	0 1 2 3	___
BRAZO IZQUIERDO	No claudica. BM 5. Claudica. BM 4. Algún esfuerzo contra gravedad. BM 3. Sin esfuerzo contra gravedad. BM 2-1. Ningún movimiento. BM 0.	0 1 2 3 4	___
BRAZO DERECHO	No claudica. BM 5. Claudica. BM 4. Algún esfuerzo contra gravedad. BM 3. Sin esfuerzo contra gravedad. BM 2-1. Ningún movimiento. BM 0.	0 1 2 3 4	___
PIERNA IZQUIERDA	No claudica. BM 5. Claudica. BM 4. Algún esfuerzo contra gravedad. BM 3. Sin esfuerzo contra gravedad. BM 2-1. Ningún movimiento. BM 0.	0 1 2 3 4	___
PIERNA DERECHA	No claudica. BM 5. Claudica. BM 4. Algún esfuerzo contra gravedad. BM 3. Sin esfuerzo contra gravedad. BM 2-1. Ningún movimiento. BM 0.	0 1 2 3 4	___
ATAXIA de MIEMBROS	Ausente. Presente en una extremidad. Presente en dos extremidades. Si está presente se localiza en: Brazo derecho 1= Sí 0= No Brazo izquierdo 1= Sí 0= No Pierna derecha 1= Sí 0= No Pierna izquierda 1= Sí 0= No	0 1 2	___ ___ ___ ___
SENSIBILIDAD	Normal. Hipoestesia ligera a moderada. Hipoestesia severa o anestesia.	0 1 2	___
LENGUAJE	Normal, sin afasia. Afasia ligera a moderada. Afasia severa. Broca, Wernicke... Afasia global o mutismo.	0 1 2 3	___
DISARTRIA	Articulación normal Ligera a moderada. Severa o anartria.	0 1 2	___
EXTINCIÓN	Sin anormalidad. Parcial (sólo una modalidad afectada) Completa (más de una modalidad)	0 1 2	___

ANEXO 2. Clasificación de las complicaciones hemorrágicas tras la trombolisis

HI1 PEQUEÑAS PETEQUIAS A LO LARGO DE LOS MÁRGENES DEL INFARTO

HI2 PETEQUIAS MÁS CONFLUENTES DENTRO DEL ÁREA DE INFARTO, SIN EFECTO MASA

PH1 ZONA HEMORRÁGICA QUE NO SUPERA EL 30% DEL ÁREA DEL INFARTO

PH2 ZONA HEMORRÁGICA QUE SUPERA EL 30% DEL ÁREA DEL INFARTO, CON EFECTO DE MASA IMPORTANTE

PHr1 ZONA HEMORRÁGICA DE TAMAÑO PEQUEÑO O MEDIO SITUADOS LEJOS DEL INFARTO; PODRÍA EXISTIR UNA OCUPACIÓN POR EFECTO DE MASA LEVE.

PHr2 ZONAS HEMORRÁGICAS GRANDES, CONFLUENTES Y DENSOS, EN UN ÁREA ALEJADA DEL INFARTO; PUEDE EXISTIR UNA OCUPACIÓN POR EFECTO DE MASA IMPORTANTE

ANEXO 3. ESCALA DE RANKIN MODIFICADA (mRS).

0	Sin síntomas	
1	Sin incapacidad importante	Con síntomas pero es capaz de realizar todas sus actividades habituales igual que antes
2	Incapacidad leve	No es capaz de realizar todas las actividades como antes pero puede realizar el autocuidado sin ayuda
3	Incapacidad moderada	Necesita alguna ayuda. Camina sin ayuda
4	Incapacidad moderadamente severa	Necesita ayuda para caminar
5	Incapacidad severa	Encamado, incontinente y ayuda para todas las actividades
6	Muerte	