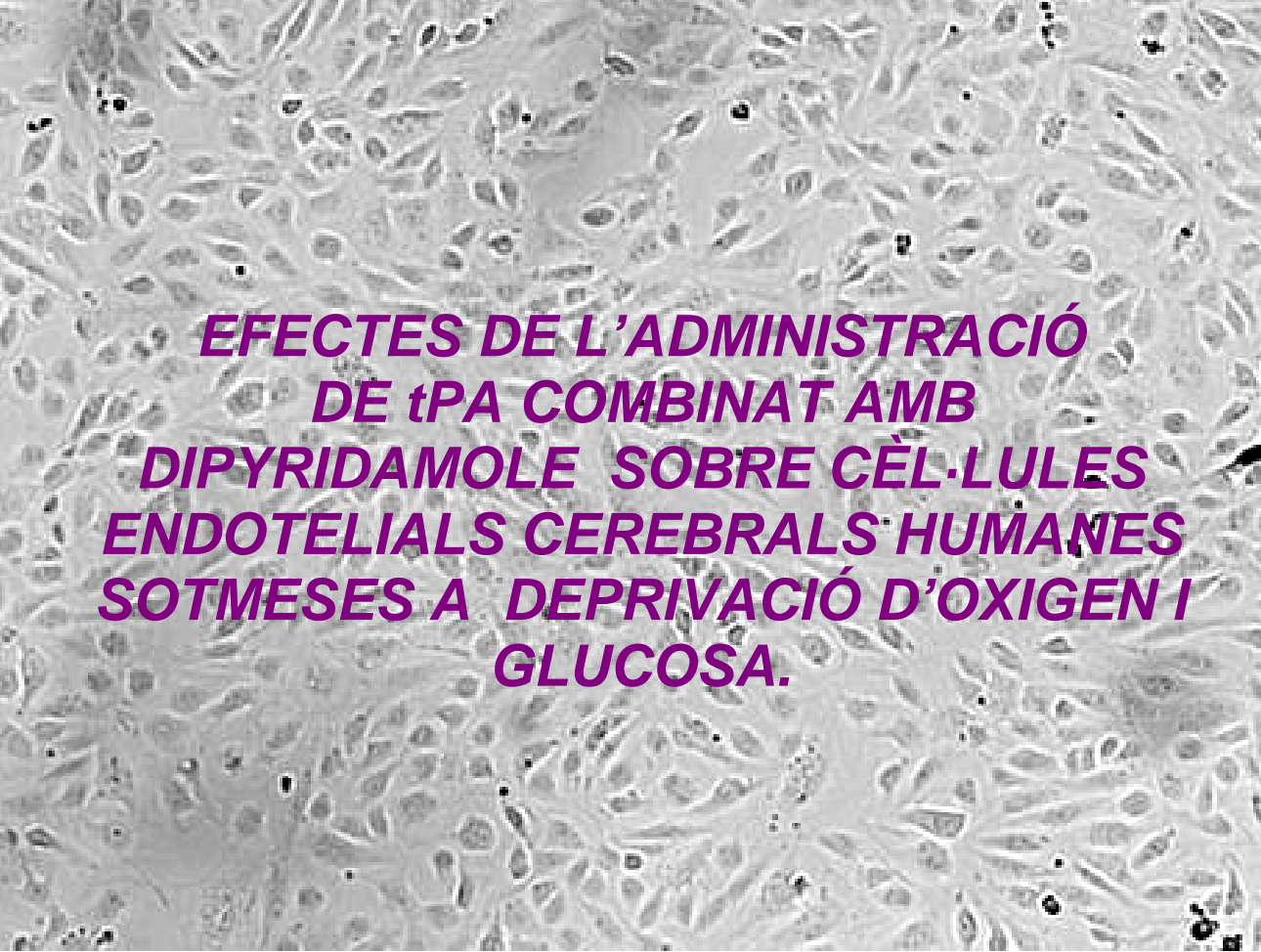


TREBALL DE RECERCA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA INTERNA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

A grayscale phase-contrast micrograph showing a dense population of human brain endothelial cells. The cells are elongated and spindle-shaped, with visible nuclei and some smaller, darker spots scattered throughout the field.

***EFFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ
DE tPA COMBINAT AMB
DIPYRIDAMOLE SOBRE CÈL·LULES
ENDOTELIALS CEREBRALS HUMANES
SOTMESES A DEPRIVACIÓ D'OXIGEN I
GLUCOSA.***

Mireia Parés Oliva

Laboratori d'Investigació Neurovascular,
Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebrón, setembre 2010

TREBALL DE RECERCA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA INTERNA
DEPARTAMENT DE MEDICINA



EFFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ DE tPA
COMBINAT AMB DIPYRIDAMOLE SOBRE
CÈL·LULES ENDOTELIALS CEREBRALS
HUMANES SOTMESES A DEPRIVACIÓ D'OXIGEN
I GLUCOSA.

AUTORA: Mireia Parés Oliva

TUTORS: Mar Hernández-Guillamón
Joan Montaner Villalonga

Laboratori d'Investigació Neurovascular,
Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebrón,
Edifici Mediterrània, Laboratori 110,
Passeig Vall d'Hebron, 119-129 08035
Barcelona, setembre 2010.

ANEXES

DR. JOAN MONTANER VILLALONGA, coordinador del Laboratori d'Investigació Neurovascular de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

FA CONSTAR,

que el treball "***EFFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ DE tPA COMBINAT AMB DIPYRIDAMOLE SOBRE CÈL·LULES ENDOTELIALS CEREBRALS HUMANES SOTMESES A DEPRIVACIÓ D'OXIGEN I GLUCOSA.***" ha estat realitzat sota la meva direcció per la llicenciada **MIREIA PARÉS OLIVA**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2009-2010), a la convocatòria de **setembre**.

Barcelona, 2 de setembre de dos mil deu.

DR. MAR HERNÁNDEZ-GUILLAMÓN, codirector del Treball de Recerca "**EFFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ DE tPA COMBINAT AMB DIPYRIDAMOLE SOBRE CÈL·LULES ENDOTELIALS CEREBRALS HUMANES SOTMESES A DEPRIVACIÓ D'OXIGEN I GLUCOSA**"

FA CONSTAR,

que el treball "**EFFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ DE tPA COMBINAT AMB DIPYRIDAMOLE SOBRE CÈL·LULES ENDOTELIALS CEREBRALS HUMANES SOTMESES A DEPRIVACIÓ D'OXIGEN I GLUCOSA**" ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciada llicenciada **MIREIA PARÉS OLIVA** trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2009-2010), a la convocatòria de **setembre**.

Barcelona, 2 de setembre de dos mil deu.

Agraïments:

A la meva mare, perquè ella és la que guia els meus passos allà on vaig.

A la meva germaneta, perquè no puc imaginar-me la vida sense ella.

Al meu pare, per recordar-me sempre lo molt que creu en mi.

*A tota la meva família,
a tots els meus amics,
per ser qui son, pel que signifiquen, i per tot el que han compartit amb mi.*

*A tots els meus companys de labo,
per tants moments viscuts, per fer-me tan divertit el dia a dia, per tant que he
après de cadascun d'ells.*

*A la Mar, perquè sense ella no hagués viscut tot això ni hagués fet aquest
treball.*

A tots els qui m'he anat trobant pel camí, i amb els que tant he crescut.

Especialment a tots aquells dels qui he après el sentit d'aquesta feina.

GRÀCIES

ÍNDEX

ANEXES	2
AGRAÏMENTS	4
RESUM	5
ABREVIATURES	6
INTRODUCCIÓ	7
OBJECTIUS	15
MATERIALS I MÈTODES	16
- Cultiu cel·lular	
▪ Emmagatzematge	
▪ Descongelació	
▪ Manteniment del cultiu	
▪ Subcultiu	
- Tractaments	
▪ L'activador tissular del plasminògen	
▪ Dipyridamole	
- Deprivació d'Oxigen i Glucosa	
- Assaigs de viabilitat cel·lular:	
▪ Mètode de reducció de l'MTT.	
▪ Mètode d'alliberació de LDH.	
- Zimografia en gel de Gelatina	
RESULTATS	21
- L'administració de rtPA a cèl·lules endotelials en cultiu resulta tòxic a una dosi de 100µg/mL.	
- Efecte de la deprivació d'oxigen i glucosa a cèl·lules endotelials en cultiu.	
- Efecte de l'administració d'rtPA durant l'OGD.	
- Increment de l'alliberació de Metaloproteinases 2 i 9 en resposta al tractament amb rtPA durant l'OGD.	
- Administració de Dipyridamole a cèl·lules endotelials en cultiu.	
- Efecte del tractament amb Dipyridamole sobre la reducció de viabilitat cel·lular induïda per l'administració d'rtPA durant l'OGD.	
DISCUSSIÓ	28
CONCLUSIONS	33
REFERÈNCIES	34

RESUM

El DP és un agent usat de forma comú en la prevenció secundària de l'ictus per les seves propietats antiplaquetars. Ha estat proposat com a possible teràpia coadjuvant del tractament trombolític en fase aguda de l'ictus isquèmic amb rtPA neuroprotector per les seves propietats neuroprotectores, antiinflamatòries i antioxidants.

En el present treball s'analitza la toxicitat de l'administració d'rtPA en cèl·lules endotelials cerebrals humanes sotmeses a isquèmia, així com els seus efectes sobre l'activació de MMPs. Posteriorment es combina l'administració d'rtPA amb Dipyridamole i s'analitzen els efectes en la toxicitat cel·lular i l'expressió d'MMPs.

ABREVIATURES

AC: Adenilat Ciclasa

AIT: Atac Isquèmic Transitori

AMPc: Adenosina Monofosfat Ciclasa

ASA: Àcid Acetil Salicilic

ATP: Adenosina Trifosfat.

BHE: Barrera hematoencefàlica

DP: *Dipyridamole*

FDA: *Food and Drug Administration*

GMPc: Guanosina Monofosfat ciclasa

HIC: Hemorragia intracerebral

LRP: *Low Density Lipoprotein Related Receptors*

MEC: Matriu extracel·lular

MMPs: Metal·loproteinases de Matriu

NMDA: *N-methyl-D-aspartic acid*

NO: *Nitric oxide*

OGD: *Oxygen and Glucose Deprivation*, (Deprivació d'Oxigen i Glucosa)

PDE-5: Phosphodiesterasa 5

ROS: *Reactive Oxygen Species*, (Espècies Reactives de l'Oxigen)

rtPA: recombinant Tissue Plasminògen Activator

SNC: Sistema Nerviós Central

TH: Transformació hemorràgica

TIMP: *Tissue inhibitor of Metalloproteinases*, (Inhibidor Tissular de Metal·loproteinases)

UNV: Unitat neurovascular

WT: *wild type*, (Silvestre)

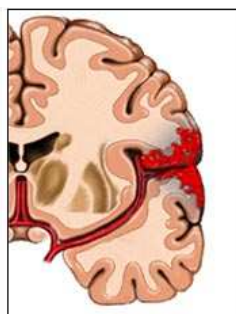
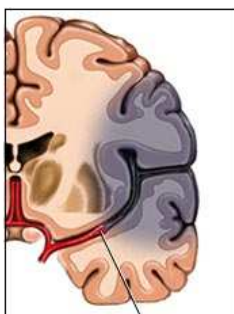
INTRODUCCIÓ

I. L'ICTUS

La patologia neurovascular aguda o **ictus** és un trastorn en una zona del parènquima encefàlic degut a una alteració aguda en el flux dels vasos sanguinis cerebrals. Els resultats d'aquests trastorns donaran lloc a dèficits neurològics, com afàsia, hemiparèsia, pèrdua de consciència, pèrdua de visió o vertigen, entre d'altres, segons la zona de l'encèfal afectada. Aquests dèficits poden ser transitoris o permanents, depenent de l'evolució clínica i del tipus d'oclusió (Adams et al., 1993).

L'ictus es pot classificar en dos tipus depenent si s'ha produït com a resultat de la ruptura d'un vas sanguini cerebral (*ictus hemorràgics*), que produeix l'extravasació de sang a l'interior del parènquima encefàlic, o per l'obstrucció del vas (*ictus isquèmics*) que interromp el flux sanguini (Adams et al., 1993).

Aquesta malaltia constitueix un dels problemes més importants del nostre sistema sanitari, ja que la incidència anual és de 150-200 casos per cada 100.000 habitants. L'ictus és en l'actualitat la primera causa de mortalitat, representant el 11,5% del total de defuncions del nostre país i és la primera causa d'incapacitat física i invalidesa a llarg termini a causa de les seqüeles motores i sensibles que deixa (Adams et al., 1993). Els principals factors de risc que s'associen a l'ictus són: hipertensió, diabetis, tabaquisme, hipercolesterolèmia, alcoholisme, sedentarisme, obesitat, i és marcadament prevalent a partir dels 65 anys (Larrue et al., 1996).



Imatge d'un cervell mostrant l'oclusió d'una artèria cerebral (ictus isquèmic) o el trencament d'un vas amb extravasació de sang al parènquima cerebral (ictus hemorràgics).
(Modificat de © 2008 Nucleus Medical Art, Inc.)

II. L' ICTUS ISQUÈMIC

L'**ictus isquèmic** suposa un 80% del total d'ictus que es produeixen. És el resultat de l'oclusió d'una artèria cerebral de mitjà o gran calibre i generalment pot tenir un origen cardioembòlic o aterotrombòtic. Els primers són originats per l'obstrucció d'una artèria cerebral per un coàgul d'origen cardíac, mentre que els segons es produeixen per la formació d'èmbols o trombus locals en algunes artèries amb estenosi ateroscleròtiques (Adams et al., 1993).

Com a conseqüència de la interrupció del flux sanguini es produeix una lesió tissular anomenada *core* de l'infart. Si durant les primeres hores no es produeix la recanalització espontània de l'arteria, s'ha de procedir a intentar llisar el coàgul per tractar d'evitar el

creixement de l' infart a zones perifèriques també hipoperfoses i metabòlicament afectades però encara salvables (*penombra isquèmica*), que poden quedar incloses dins l'àrea infartada (Obrenovitch,1995 i Sharp et al., 2000).

Amb l'obstrucció de l'artèria i a causa de la privació de nutrients i oxigen s'inicia la cascada isquèmica que, des del primer moment, comporta canvis metabòlics a nivell cel·lular i tissular que s'allarguen en els dies posteriors amb un curs característic. Els processos que es produeixen immediatament després de l'oclusió de l'artèria inclouen la pèrdua energètica per la caiguda dels nivells d'ATP, despolarització de membrana amb la consegüent alliberació de neurotransmissors com el glutamat, que produeix l'edema excitotòxic, estres oxidatiu per la formació de gran quantitat de radicals lliures, lesions a l'endoteli vascular que comporten alteracions en la barrera hematoencefàlica (BHE) i formació d'edema vasogènic secundari (Nishizawa., 2001).

En les primeres hores després de la isquèmia es produeix també la resposta inflamatòria. Aquesta s'allarga durant els dies següents i provoca efectes adversos com dany tissular, mort neuronal i pèrdua d'integritat vascular (Chamorro et al., 2004 i Zheng et al., 2004). En la resposta inflamatòria local, la microglia contribueix a l'alliberament de citocines i quimiocines que influencien en l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials (Frijns et al.,2002). Aquests canvis vasculars comporten el reclutament de leucòcits, la seva adhesió i migració a través de l'endoteli amb la consegüent augment de permeabilitat de BHE. La infiltració d'aquestes cèl·lules inflamatòries juntament amb les cèl·lules del sistema nerviós produeixen també l'activació d'alguns sistemes de proteòlisi i remodelat de la matriu extracel·lular. Entre aquests es troben les metal·loproteinases de matriu (MMP), que amplifiquen el dany tissular i contribueixen a processos de mort neuronal (Akopov et al.;1996 i Fukuda et al.;2004).

III. EL TRACTAMENT TROMBOLÍTIC AMB rtPA

En l'actualitat, tan sols disposem d'un tractament de reperfusió efectiu durant les primeres hores de l'inici dels símptomes i, malauradament, tan sols una mínima part dels nostres pacients es beneficien d'aquests tractaments de fase aguda (al voltant del 5-10%) (Hacke et al., 2008). Aquest és el tractament trombolític, que consisteix en l'administració de l'activador tissular del plasminogen recombinant (rtPA). Actualment és la única opció terapèutica aprovada per la FDA en la fase aguda de l'ictus isquèmic per intentar lliurar el trombus i reperfondre la zona infartada, per tractar d'evitar que l' infart establert inicialment creixi i recluti parènquima de penombra (NINDS; 1995).

El fibrinolític administrat, rtPA, és una serin-proteasa d'un pes molecular aproximat de 70kDa. El seu paper clàssic en la cascada fibrinolítica respon a la catàlisi específica del plasminogen a plasmina. Aquesta activació es dona mitjançant el tall del plasminogen per l'enllaç peptídic

Arg560-Val561, resultant en la formació de la plasmina, de dues cadenes peptídiques unides per un pont disulfur. La plasmina en sang, actua degradant els clots de fibrina (Vassalli et al., 1991).

A més d'expressar-se en sang on exerceix les seves accions en la cascada fibrinolítica, el tPA endogen també s'expressa al sistema nerviós central (SNC). Diferents poblacions cel·lulars com la glia i les neurones expressen i sintetitzen tPA, així com també ho fa la microglia activada (Krystosek et al., 1988 i Rogove et al., 1999). Al parènquima cerebral exerceix diferents funcions, sent clau en el manteniment de la homeòstasi i la funcionalitat de les neurones (Sappino et al., 1993 i Davies et al., 1998). En aquestes es troba contingut en vesícules presinàptiques, les quals són alliberades per una despolarització de la membrana (Baranes et al., 1996). El tPA alliberat pot interactuar amb els receptors NMDA del terminal post sinàptic, on influencia en la senyalització del glutamat. El tPA que queda al compartiment extracel·lular pot ser recaptat pels astròcits per un mecanisme dependent dels receptors LRP (*low density lipoprotein-related receptors*) (Fernández-Monreal et al., 2004).

La principal limitació de l'ús del rtPA com a teràpia trombolítica és l'estreta finestra terapèutica, limitada inicialment a les 3 primeres hores des de l' inici dels símptomes i ampliada recentment a quatre hores i mitja (NINDS, 1995, Anon, 1997, Hacke et al., 2004). Això és degut als efectes adversos que pot ocasionar l'rtPA si s'administra més tardanament. Algunes complicacions són el dany neuronal (Wang et al., 1998) o la transformació hemorràgica (TH), que afecta un 5-10% dels malalts tractats i que comporten una alta taxa de mortalitat (Sloan, 1987).

La transformació hemorràgica és un fenomen multifactorial en el qual el teixit cerebral isquèmic pateix la ruptura del vas i es converteix en una lesió hemorràgica (Rosell et al., 2008). La infiltració al cervell de neutròfils provinents de sang perifèrica compromet la integritat de la BHE, augmentant el risc de TH. Això pot contribuir de forma adicional al dany cerebral després de l'ictus, sent les hemorràgies induïdes pel tractament trombolític especialment perilloses (Montaner et al, 2003 and Rosell et al, 2008).

Diversos investigadors suporten el paper del tPA com a agravant del dany neuronal produït per l'ictus. Així, s'ha observat que ratolins deficients en tPA (*knock out* tPA) sotmesos a una isquèmia cerebral focal mostren una clara reducció del volum d'infart respecte ratolins *wild type* (wt). Aquestes observacions suggereixen un paper del tPA en la neurotoxicitat induïda per la isquèmia cerebral. (Wang et al., 1998 i Nagai et al., 1999).

Estudis *in vitro* apunten que el tPA catalitza el tall d'una subunitat del receptor de NMDA que fa incrementar la seva activitat. Aquesta potenciació del receptor NMDA amplifica l'influx de Ca^{2+} , que indueix mort neuronal per excitotoxicitat (Bencheane et al., 2004). La inhibició de l'activitat catalítica del tPA reverteix la neurotoxicitat (Nicole et al., 2001). Aquests resultats indiquen la

capacitat del tPA de potenciar la mort neuronal induïda per excitotoxicitat a través de receptors de NMDA. A més, les neurones d'hipocamp de ratolins deficients en tPA són resistents a la degeneració induïda per excitotoxina (Tsirka et al., 1996). Per altra banda, s'ha demostrat que el rtPA administrat de forma exògena indueix apoptosi en cultius neuronals (Flavin et al., 1999). També s'ha demostrat la toxicitat de l'rtPA administrat en cultiu de cèl·lules endotelials de còrnea humanes (Yoeruek et al., 2008), així com la potenciació de l'apoptosi en endoteli cerebral humà isquèmic (Liu et al., 2004). A més, cultius primaris de neurones de ratolins deficients pel gen de tPA són resistents a un model de privació d'oxigen i glucosa (OGD, de l'anglès *Oxygen and Glucose Deprivation*). Aquest es tracta d'un model *in vitro* en el qual s'incuben els cultius en medis sense oxigen ni glucosa. Això reproduïx la interrupció de l'aport d'oxigen i nutrients que té lloc durant un episodi isquèmic (Nagai et al., 2001). De fet, també s'ha observat que l'OGD es capaç de potenciar la extravasació de l'rtPA a través de l'endoteli en models de BHE, on promourà el dany neuronal (Benchenane et al., 2005).

IV. LES METAL·LOPROTEINASES DE MATRIU

Les metal·loproteïnases de matriu (MMPs), són una família de proteases Zinc-dependents que degraden components que formen la matriu extracel·lular. Es classifiquen clàssicament en funció del substrat principal que degraden: col·lagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), estromelisines (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metal·loelastases (MMP-12), matrilisines (MMP-7, MMP-26) (Overall and Lopez-Otin, 2002) i les gelatinases (MMP-2, MMP-9), que ataquen específicament el col·lagen tipus IV, la laminina i la fibronectina, els components majoritaris de la lamina basal que envolta els vasos cerebrals (Mun-Bryce i Rosenberg, 1998). Aquestes últimes són especialment importants en el context del nostre estudi.

Amb diferències i excepcions, totes les MMPs comparteixen 3 dominis estructurals bàsics:

- El domini propèptid (N-terminal), conté una seqüència consens i es lliga al zinc catalític per mantenir les pro-MMPs inactives.
- El domini catalític, conté un ió zinc i 2-3 ions calci necessaris per a l'estabilitat i l'expressió de l'activitat enzimàtica.
- El domini hemopexina (C-terminal), connecta amb el domini catalític mitjançant una seqüència frontissa.

Totes elles es sintetitzen com enzims inactius (zimògens) i tenen en el fragment N-terminal una seqüència senyal necessària per a la seva secreció i un domini propèptid que s'ha de tallar per a la seva activació (Nagase i Woessner, 1999).

L'activitat catalítica de les MMPs està regulada bàsicament a quatre nivells: per l'expressió gènica, per processos de compartimentalització, per l'activació del zimogen i per la inhibició de l'activitat enzimàtica. L'activació del zimogen es deu al trencament del pont d'unió entre el domini propèptid i el domini catalític, que es produeix principalment per proteòlisi directa però

que també pot donar-se per altres mecanismes. La seva inhibició endògena es deu a l'acció dels *Inhibidors Tissulars de les Metal·loproteïnases de Matriu*, anomenats TIMPs. Els TIMPs són una família de quatre proteïnes secretades per diferents tipus cel·lulars amb una elevada afinitat per les MMPs, que bloquegen la seva capacitat proteolítica (Brew et al., 2010).

Les MMPs tenen un paper essencial en el remodelat de la matriu extracel·lular i de la làmina basal, i estan implicades en gran varietat de processos tant fisiològics com patològics (Linjen et al., 2001 i Matrisian, 1990). Participen en el desenvolupament embrionari, l'ovulació, el remodelat ossi i de l'endometri i en l'angiogènesi entre d'altres, però també en malalties neuroinflamatòries com l'ictus, en les quals poden ser determinants (Candelario-Jalil et al., 2009).

IV.1 PAPER DE LES GELATINASES (MMP-2 I MMP-9) EN L' ICTUS ISQUÈMIC

En models murins d'isquèmia cerebral s'observa un augment tant de l'expressió com de l'activació de MMP-2 i MMP-9 (Rosenberg et al., 1996). S'ha vist que la MMP-9 es sobreexpressa principalment a l'endoteli vascular després de la inducció d'isquèmia (Asahi et al., 2000). En models d'isquèmia cerebral focal en ratolins *knock out* pel gen de la MMP-9 es redueix la degradació dels components de la BHE i la seva disrupció, a més d'observar-se una disminució del volum d'infart (Asahi, 2000). En el cas de la MMP-2, en models en primats no humans s'observa que aquest augment es relaciona amb una desestabilització inicial de la BHE (Chang et al.; 2003 i Heo et al., 1999). De fet, l'increment de la MMP-2 es correlaciona amb una disrupció de la BHE dins les primeres hores després de la reperfusió. Aquesta disrupció queda bloquejada per l'administració d'inhibidors d'MMPs (Rosenberg et al., 1998; Chang et al., 2003 i Yang et al., 2007). L'augment de la MMP-9 en canvi, s'associa a una obertura més tardana que no respon als inhibidors. Aquest fet suggereix que en les dues fases de l'obertura de la BHE tenen lloc diferents mecanismes (Rosenberg et al., 1998). L'augment més tardà de la MMP-9 podria produir un efecte més sever i fins i tot el trencament de la BHE, donant lloc a hemorràgies intraparenquimatoses (Gasche et al.; 1999; Fujimura et al., 1999; Chang et al., 2003 i Heo et al., 1999).

Aquesta sobreexpressió també s'observa a teixit cerebral humà isquèmic, sent especialment important la MMP-9 (Clark et al, 1997 i Rosell et al, 2006). En un estudi del nostre grup es demostra que al *core* de l'infart la MMP-9 es troba principalment localitzada al voltant dels vasos cerebrals, associada a la infiltració de neutròfils i a microglia reactiva. La zona peri-infart mostra uns nivells superiors de MMP-9 respecte a l'hemisferi contralateral, i s'observa que la microglia és la font principal en aquesta àrea (Rosell et al, 2006). A més, els nivells en plasma d'MMP-9 de pacients amb ictus s'associen amb un major el dèficit neurològic i volum d'infart (Montaner et al, 2001). Els nivells basals de MMP-9 també prediuen el risc de TH en humans

després del tractament trombolític. Per tant, la seva determinació en plasma previament al tractament podria millorar-ne l'eficàcia (Montaner et al, 2003).

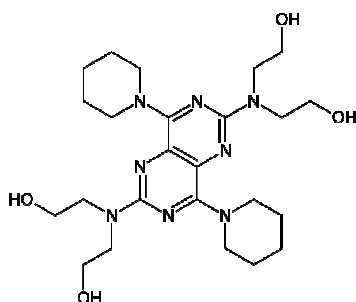
En un estudi del nostre grup, hem pogut observar que la infiltració de neutròfils a àrees isquèmiques amb alt contingut de MMP-9, està relacionada amb la degradació del col·lagen IV de la làmina basal, fet que compromet la integritat de la BHE (Rosell A et al., 2008). Per altra banda, en estudis *ex vivo*, hem observat que els grànuls de neutròfils humans són una font important de MMP-9. En aquest mateix estudi hem vist que el tractament amb rtPA promou la degranulació i l'alliberació de la MMP-9 d'aquestes cèl·lules (Cuadrado et al, 2008).

En models murins d'isquèmia cerebral focal també s'ha demostrat que el tPA augmenta els nivells de MMP-9 (Wang et al., 2003). A més, cèl·lules endotelials cerebrals de ratolí tractades amb rtPA mostraen un increment de l'alliberació dosi-depenent d'ambdúes Gelatinases (Wang et al., 2003). S'ha observat que el tPA pot promoure la disrupció i ruptura de la BHE i que és capaç de difondre al parènquima cerebral (Yepes et al., 2003). En aquesta ruptura s'ha vist involucrada la MMP-9, sent d'especial importància l'efecte d'aquesta proteasa en l'hemorràgia induïda per l'administració d'rtPA (Eng et al., 2002). A més, en models murins la obertura de la BHE es relaciona amb la mortalitat deguda a la reperfusió per rtPA. En animals tractats amb inhibidors de MMPs s'aconsegueix reduir aquesta elevada mortalitat, suggerint que el tractament amb inhibidors podria reduir el risc associat a la trombòlisi (Rosenberg et al., 2003).

V. EFECTES DEL DIPYRIDAMOLE (DP) EN L'ICTUS ISQUÈMIC

El Dipyridamole (DP(2,2',2'',2'''-(4,8-di(piperidin-1-yl)pyrimido[5,4-d]pyrimidine-2,6-diyl)bis(azanetriyl)tetraethanol) (DP), és una substància cristal·lina groga i altament lipofílica. És soluble en àcids diluïts, metanol i cloroform, i pràcticament insoluble en aigua (Pulgarín et al., 1997). El DP es sintetitza comercialment per Boehringer, Ingelheim (Aggrenox®) en format càpsules aspirina/DP de 25mg/200mg usades per administració oral.

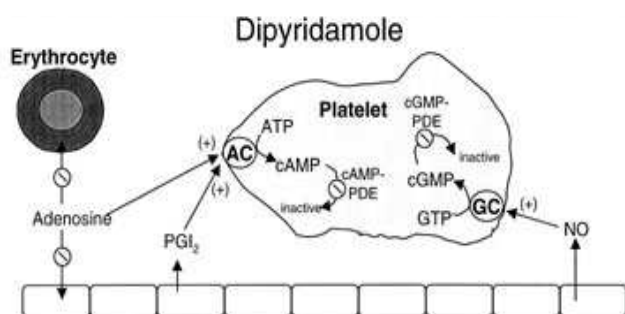
El DP és un fàrmac que administrat com a tractament crònic actua com a antiagregant plaquetari, inhibint la formació de trombus, i causa vasodilatació quan s'administra de forma puntual a dosi elevades. Així, com altres antiagregants plaquetars com l'aspirina, el DP té efectes clínics demostrats en la prevenció de l'ictus isquèmic i l'infart de miocardi (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994).



Estructura del Dipyridamole.
(Modificat de Murillo Pulgarín, 1997).

De fet, el DP és un agent usat de forma comú en la prevenció secundària de l'ictus. En l'estudi ESPTS-2 (*European Stroke Prevention Study 2*), dut a terme en una sèrie de pacients que havien tingut un ictus isquèmic o un atac isquèmic transitori (AIT), es va demostrar que el DP administrat en combinació amb l'aspirina (ASA) reduïa de forma significativa el risc de recurrència de complicacions vasculars (entre elles l' ictus isquèmic i l' infart de miocardi) respecte la teràpia amb aspirina sola (Diener HC, 1996 and 1998). Un altre estudi dut a terme per la *European/Australasian Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial* (ESPIRIT) amb el mateix disseny va donar els mateixos resultats (The ESPIRIT Study Group, 2006). Aquests dos estudis van mostrar la superioritat del tractament combinat sobre la monoteràpia amb aspirina. En l'estudi PProFESS (*Prevention Régimen for Effectively avoiding Second Strokes*) es va voler comparar aquesta teràpia combinada amb el Clopidogrel. Es van seleccionar pacients confirmats d'ictus isquèmic o AIT. No es van observar diferències pel que fa al risc de recurrència entre els dos grups però, contràriament al que s'esperava, es van observar més hemorràgies intracerebrals en el grup DP-ASA que en el grup Clopidogrel (Cardiovasc J Afr. PProFESS trial 2008).

Mentre que l'aspirina exerceix els seus efectes antitrombòtics mitjançant la inhibició irreversible de l'inhibidor de la Ciclooxygenasa-1 (COX-1), el DP sembla actuar a través de diversos sistemes antiplaquetars (Patrono et al., 2001). Un dels seus mecanismes d'acció consisteix en la inhibició de la recaptació d'Adenosina a les plaquetes, eritròcits i les cèl·lules endotelials, així com també la inhibició de l'Adenosina Deaminasa, enzim que metabolitza l'Adenosina a Inosina (Best LC, 1979). D'aquesta manera, les elevades concentracions d'adenosina assolides a l'espai extracel·lular interactuen amb els seus receptors a les plaquetes, on poden augmentar els nivells d'AMPc intracel·lulars via l'activació de l'Adenilat Ciclasa (AC). Aquests elevats nivells d'AMPc inhibeixen de forma reversible l'agregació plaquetària i causen relaxació de la musculatura llisa vascular (Kim et al., 2008). És també un inhibidor de l'enzim fosfodiesterasa-5 (PDE-5), que augmenta els nivells intracel·lulars de cAMP i cGMP, contribuint de la mateixa manera a inhibir l'agregació de les plaquetes (Asano et al., 1977 i Best et al., 1979).



Mecanismes d'acció del Dipyridamole.
El DP inhibeix la recaptació d'adenosina pels eritròcits i cèl·lules endotelials, incrementant la concentració local d'adenosina. Això fa incrementar els nivells d'AMPc de les plaquetes. També inhibeix PDEs plaquetars, que inactiven AMPc i GMPC. Aquests són produïts per l'acció de l'AC i la GC a partir d'ATP i GTP respectivament. (Modificat de Pettigrew et al., 2001).

A més de les seves propietats com a antiagregant plaquetar i regulador de la vasculatura, s'ha postulat recentment que el DP podria tenir també propietats neuroprotectores (Blake et al., 2003), antioxidants (Iuliano et al, 1989; 1996; 2000 i Vargas et al. 2001;2003) i antiinflamatòries

(Iuliano et al., 1992). Seria possible que el DP estigues exercint aquestes accions en mecanismes fisiopatològics, com és el cas de l'ictus.

OBJECTIUS

- 1) Provar en un model *in vitro* de cèl·lules endotelials cerebrals humanes l'efecte de l'administració d'rtPA mitjançant la determinació de la toxicitat cel·lular.

- 2) Estudiar en cèl·lules endotelials cerebrals humanes l'efecte de la deprivació d'oxigen i glucosa (OGD), com a model per simular la falta d'oxigen i nutrients durant la isquèmia cerebral.

- 3) Combinar els estímuls d'OGD i tractament amb rtPA per tal d'avaluar-ne els efectes sobre cèl·lules endotelials cerebrals humanes mitjançant assaigs de viabilitat cel·lular i alliberació de Gelatinases (MMP-2 i MMP-9).

- 4) Estudiar si l'administració de *Dipyridamole* (DP) es capaç de revertir els efectes induïts pels estímuls d'OGD i el tractament d'rtPA. En aquest model s'estudiaran els possibles efectes del DP quan s'administra com a pre-tractament, abans de l'OGD i el tractament trombolític, durant l'OGD, o durant el període de reoxigenació.

MATERIAL I MÈTODES

- Cultiu cel·lular

Es va utilitzar una línia immortalitzada de cèl·lules endotelials cerebrals hCMEC/D3 (*human cerebral microvascular endothelial cells*) que havia estat prèviament caracteritzada a l'Institut Cochin, Université René Descartes, Paris, France (Weksler, 2005). Aquesta línia cel·lular va ser cedida al passatge número 26.

Emmagatzematge

Un cop al nostre laboratori, es va procedir a la seva expansió per amplificació del flasc d'origen i emmagatzematge en vials de 1'5mL en nitrogen líquid. El rang de passatges per a la congelació va ser entre els 27 i 30 per a mantenir les característiques fenotípiques de la línia. La preservació de les cèl·lules es va realitzar mitjançant un protocol de congelació a -80°C (per un període no superior a tres mesos) o en nitrogen líquid, i en presència d'un agent crioprotector com el DMSO (Sigma-Aldrich, Espanya). Aquest agent té la propietat de protegir les cèl·lules del dany físic degut a la formació de cristalls de gel i de l'alteració osmòtica provocada per l'increment de la concentració de sals en el medi extracel·lular. En general, es recomana fer la congelació de manera paulatina per evitar la formació de cristalls de gel intracel·lulars, mentre que la descongelació s'ha de fer de manera ràpida, per tal d'augmentar la supervivència de les cèl·lules.

Descongelació

Per dur a terme la descongelació, es van extreure els criotubs del tanc de nitrogen i es van introduir ràpidament en un bany a 37°C, sense submergir-los del tot. Un cop descongelada la suspensió cel·lular, es va transferir el contingut del criotub a flascs precotinats amb col·lagen i amb medi de creixement prèviament temperat a 37°C. Després de 24 hores, es va canviar el medi per eliminar el DMSO i les possibles restes cel·lulars. A partir d'aquesta punt, les cèl·lules es van mantenir normalment.

Manteniment del cultiu

Les cèl·lules descongelades i cultivades es van mantenir en incubadors a 37° i a una atmosfera humida controlada al 5% de CO₂ / 95 % d'aire. Es van fer créixer en flascs prèviament precotinats amb una solució de col·lagen tipus I a una concentració de 67µg/mL (Becton-Dickinson Biosciences) durant al menys 1 hora.

El medi de creixement utilitzat EBM-2 (Lonza, Espanya) es va suplementar amb 1/2 del volum total dels factors de creixement subministrats pel mateix distribuïdor (VEGF, hFGF-B, hidro cortisona, R3-IGF-1, àcid ascòrbic, hEGF, GA-100, heparina i 2.5% de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco, Invitrogen, UK). El medi es va canviar cada 2-3 dies per al creixement rutinari.

Subcultiu

Per la expansió de les cèl·lules es va procedir a un procés de tripsinització per tal d'aixecar-les del substrat i sembrar-les a una densitat adequada en una altra placa. Abans de la tripsinització, es van fer dos rentats amb PBS (Sigma-Aldrich) . Seguidament, es van afegir $35\mu\text{l}/\text{cm}^2$ tripsina-EDTA (Invitrogen, USA) i es van incubar a 37°C durant 5 minuts per permetre que fes el seu efecte. Es va parar l'acció d'aquesta amb un volum de medi de creixement tres vegades superior i es va centrifugar la suspensió durant 5 minuts a 1000rpm. Es va resuspendre el *pellet* en medi complet i es va procedir al recompte cel·lular mitjançant el principi d'exclusió del colorant vital Blau de Tripà en una cambra de Neubauer. Una vegada es va conèixer el nombre de cèl·lules, es va diluir la suspensió inicial per tal d'obtenir la densitat cel·lular adequada per sembrar les noves plaques.

- **Tractaments**

Pels experiments, les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous precotinades amb col·lagen i a una densitat de 100.000cèls/mL. Es van deixar créixer durant 3 dies, fins a obtenir una confluència del 80-90%. Tots els experiments es van realitzar en un mínim de 5 cultius continguts entre els passatges 27 i 35 com a màxim i cada condició es va tractar per duplicat.

L' activador tissular del plasminògen (tPA)

El tPA humà recombinant (Actilyse, Boehringer, Ingelheim; Alemanya) es va preparar a una concentració inicial de 1mg/mL resuspenent el tPA en pols en aigua estèril. Degut a que l'rtPA deixava de ser soluble en les dosi més altes en el medi de creixement habitual d'aquesta línia cel·lular (EBM-2 suplementat), es van testar diferents medis de tractament i finalment es va triar el que va donar una solubilitat més homogènia independentment de la concentració del fàrmac, l'RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). Es va realitzar una corba de toxicitat per la qual les dosi triades va ser 5, 13, 20, 50 i $100\mu\text{g}/\text{ml}$ de tPA. Com a vehicle es va utilitzar aigua destil·lada estèril.

Pels tractaments es va descartar el medi de creixement i es va fer tres rentats amb PBS 1X suplementat al 1% amb penicil·lina/estreptomicina i D(+)Glucosa 30%, per descartar restes de FBS. Es va afegir el medi de tractament, RPMI-1640 sense FBS i sense factors de creixement. El volum dels fàrmac i del corresponent vehicle es va afegir al medi fins a arribar al volum total final de $500\mu\text{l}$.

Dipyridamole (DP)

El Dipyridamole es va obtenir de Boehringer, Ingelheim; Alemanya. La solució estoc es va preparar a una concentració 1mM cada dia en fresc. El DP es va resuspendre en una solució d'àcid tartàric (Sigma-Aldrich) a una concentració de 4mM degut a la seva insolubilitat en aigua. Les dosi de DP per la corba dosi-resposta es van triar en funció de les dosi administrades en els diferents treballs revisats en la bibliografia: 0.1, 1, 10, $25\mu\text{M}$ (Chakrabarti

et al., 2005, 2005; Farinelli et al., 1998; Blake, 2003 i Kim et al., 2004). Com a vehicle es va utilitzar àcid tartàric diluït en aigua a una concentració de 4mM.

Pels tractaments es va descartar el medi de creixement i es van fer 3 rentats amb PBS 1X (Sigma-Aldrich), suplementat al 1% amb penicil·lina/estreptomicina i D(+)Glucosa 30%, per descartar restes de FBS. Es va afegir el medi de tractament, RPMI-1640 sense FBS i sense factors de creixement. El volum dels fàrmacs i els corresponents vehicles es van afegir al medi fins a arribar al volum total final de 500µl.

- **Deprivació d' oxigen i glucosa (OGD)**

Els cultius cel·lulars es van sotmetre a deprivació d'oxigen i glucosa (OGD, de l'anglès *Oxygen and Glucose Deprivation*) mitjançant la cambra d'hipòxia Invivo2 (Ruskin, Pencoed, UK) que va mantenir estable la concentració de gasos al 5% CO₂, 95% N₂, 0'5% O₂, i la temperatura a 37°. Els cultius es van tractar utilitzant medi RPMI-1640 (Gibco) sense glucosa prèviament deprivat d'oxigen dins la cambra d'hipòxia durant al menys 2 hores. En finalitzar el tractament es van treure les plaques de cultiu de la cambra i es van suplementar amb medi fresc, RPMI-1640, és a dir el mateix que es va emprar per als tractaments amb els fàrmacs.

En funció del moment respecte l'OGD en el que es van dur a terme els tractaments es van establir diferents "time-frames". Els tractaments es van administrar prèviament a la OGD (pre-tractament), durant la OGD (co-tractament) i posteriorment (post-tractament). En cas dels pre-tractaments es va utilitzar el mateix medi RPMI-1640 amb glucosa i el tractament amb els fàrmacs, i posteriorment es va sotmetre els cultius a condicions de normòxia/normoglicèmia o OGD. Pel co-tractament es va utilitzar RPMI amb o sense glucosa depenent de la condició, i en el cas de la OGD les cèl·lules es van introduir dins la cambra d'hipòxia, on es va procedir a realitzar el tractament amb els fàrmacs. En el post-tractament, un cop finalitzada la OGD, es van reemplaçar els medis per RPMI amb glucosa en ambdós casos amb el tractament adequat.

- **Assaigs de viabilitat cel·lular**

Per a avaluar la viabilitat dels cultius en resposta als tractaments es van emprar dos mètodes utilitzats de forma comú en tècniques de laboratori que ens donen una mesura indirecta de l'estat de supervivència/mort dels cultius cel·lulars. Mentre que el primer mètode es basa en una mesura de la supervivència de les cèl·lules, el segon aporta una mesura de la toxicitat.

Mètode de reducció de l'MTT.

Es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de reducció de l'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich). Aquest assaig es basa en la capacitat de les cèl·lules vives i metabòlicament actives de reduir aquest compost mitjançant les deshidrogenases mitocondrials a sals de formarà. Aquest precipitat insoluble format a

l'interior de les cèl·lules ens dona una dada quantitativa indirecta indicativa de l'estat de proliferació-mort cel·lular (Hansen et al., 1998).

Per mesurar la formació de formazà, després dels tractaments es va descartar el medi de cultiu, es van fer tres rentats amb PBS i es va afegir medi fresc. L'MTT es va afegir al medi de les cèl·lules dissolt en aigua a una concentració de 0.5mg/mL, i es va deixar incubant durant 120 minuts a 37°C. Un cop finalitzat el temps d'incubació, el medi amb MTT es va descartar i reemplaçar per DMSO permetent la solubilització de les sals de formazà. Aquest dissolt era llegit a un espectrofotòmetre (ELX800, Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, INC) a una longitud d'ona de 590nm. La viabilitat de les cèl·lules endotelials sotmeses als diferents tractaments es va expressar com les unitats d'absorbància obtingudes expressades en percentatge respecte als controls no tractats.

Mètode d'alliberació de LDH.

La *Lactat Deshidrogenasa* (LDH) és un enzim oxidoreductasa present al citosol de les cèl·lules que catalitza la reducció del piruvat a lactat per oxidació del NADH a NAD⁺. Quan la LDH es troba extracel·lularment és un signe de pèrdua d'integritat de membrana i per tant de toxicitat. La citotoxicitat es va mesurar mitjançant l'assaig d'alliberació d'LDH al medi de cultiu (Cytotoxicity Detection Kit Plus, Roche, Mannheim, Alemanya). Es van recollir sobrenedants i llistats cel·lulars pels diferents tractaments. L'absorbància final es va llegir mitjançant l'espectrofotòmetre ELX800 a una longitud d'ona de 490nm. Els resultats es van expressar com la quantitat d' LDH alliberat al medi de cultiu respecte el total de LDH present a la cèl·lula.

- Zimografia en gel de Gelatina

La secreció i activació de gelatinases als sobrenedants dels cultius es va avaluar mitjançant Zimografia en gel de Gelatina. Es tracta d'una tècnica de digestió enzimàtica específica per detectar MMPs amb capacitat per degradar la gelatina (Gelatinasa-A, o MMP-2, i Gelatinasa B, o MMP-9).

Es van recollir els sobrenedants cel·lulars després dels experiments i es van centrifugar durant 10 minuts a 7000rpm per eliminar les restes cel·lulars. Es van carregar per volum (20µl) i es va utilitzar en tots els casos un marcador positiu que mostrava tant les proformes com les formes actives d'ambdúes Gelatinases (1:5000, Chemicon, USA).

Per a la electroforesi es van carregar volums iguals dels sobrenedants dels diferents tractaments diluïts en tampó de mostra Tris-Glicina SDS (2X) (Invitrogen) a una relació 1:1 en gels prefabricats de Novex al 10% de gelatina, 1.0mmX10carrils (Invitrogen). Les mostres es van fer córrer en tampó de Tris-Glicina SDS Running Buffer (1X) (Novex, Invitrogen) sense induir cap tractament desnaturitzant. Després de l'electroforesi, els gels es van tractar amb un tampó de renaturalització (Zymogram Renaturing (1X), Novex, Invitrogen) de les proteases durant 1 hora i posteriorment amb un tampó de revelat (Zymogram Developing Buffer (1X), Novex, Invitrogen) durant 96h a 37°C per observar l'activitat gelatinolítica.

Les bandes digerides enzimàticament per les Gelatinases es van visualitzar després de tenyir els gels amb una solució que conté Negre d'Amida (Sigma-Aldrich) al 0.1%, àcid acètic al 10% i metanol al 10% dissolts en aigua destil·lada durant 1 hora. Finalment es van destenyir mitjançant rentats de 20 minuts amb metanol al 30% i àcid acètic al 10%, que van permetre la visualització de les bandes als gels.

Les imatges es van captar mitjançant un lector de gels (Gel Logic 440 Imaging System, Kodak, Rochester, USA) i es van mesurar les intensitats de les bandes corresponents a les proformes i formes actives de les Metal·loproteïnases 2 i 9 mitjançant el corresponent Software (Kodak MI SE, Molecular Imaging Software, v.5.0.1.27, Carestream health, INC). L'activitat Gelatinasa es normalitza amb el control intern de Gelatinases i s'expressa com a l'increment d'intensitat de les bandes respecte les mostres no tractades per cada condició experimental.

RESULTATS

I. L' administració d'rtPA a cèl·lules endotelials en cultiu resulta tòxica a una dosi de 100µg/mL.

Primerament es van voler testar diferents concentracions d'rtPA per veure la resposta dels cultius a dosis creixents del fàrmac. Les dosis es va triar segons el càlcul de la concentració teòrica assolida per una persona que li fos administrat el fàrmac com a tractament trombolític. Tenint en compte un pes, alçada i volum sanguini mitjà, la concentració teòrica en sang va resultar de 13µg/mL. També es va voler trobar una dosi tòxica per avaluar la resposta de l'endoteli en aquestes condicions. Així, es va augmentar la concentració fins a 100µg/mL. Els tractaments es van prolongar durant 24 hores. Un cop finalitzat aquest temps es van realitzar els assaigs de viabilitat i toxicitat, reducció d'MTT i alliberament d'LDH respectivament.

En aquest model, no es va observar una reducció significativa de la viabilitat cel·lular per l'assaig de reducció d'MTT fins a la dosi de 50µg/mL, la qual va induir una reducció significativa del 25±6,22% respecte els controls no tractats. La dosi de 100µg/mL va induir un 40±10.10% de mort cel·lular (Fig.1A). Tot i que en la mesura d'alliberació d' LDH no es van obtenir diferències significatives degut a la major variabilitat d'aquest assaig, els resultats anaven en la mateixa direcció, observant-se un augment de la toxicitat a la dosi de 50µg/ml, que va incrementar a la dosi de 100µg/mL fins a un 26.17±9.65% (Fig.1B).

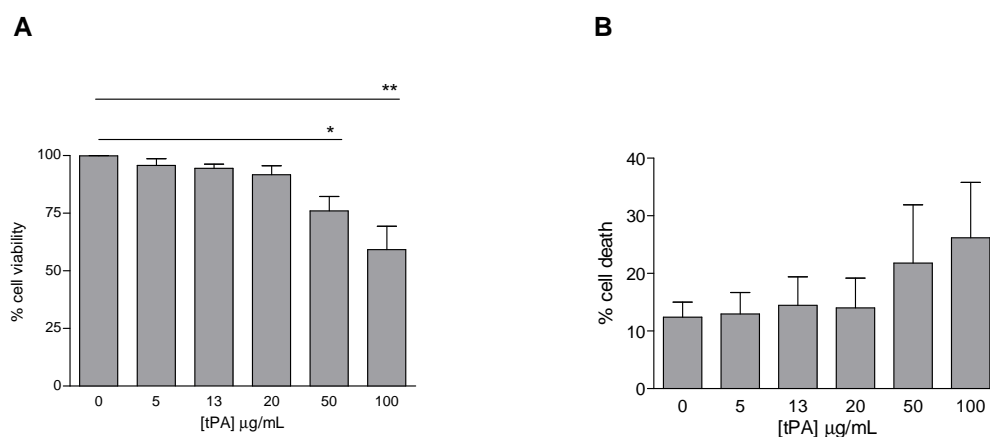


Figura 1. Quantificació de la viabilitat cel·lular en resposta a l'administració de rtPA determinada per assaigs d' activitat MTT (A) i LDH (B). Els valors es mostren com el percentatge de la mitjana±SEM respecte cèl·lules no tractades. Els valors obtinguts son el resultat d'experiments realitzats de forma independent (n=5). **p<0.01 *p<0.5.

II. Efecte de la privació d'oxigen i glucosa a cèl·lules endotelials en cultiu.

El següent pas va ser trobar un model que simulés les condicions metabòliques a les que es troben sotmeses les cèl·lules endotelials quan es pateix una isquèmia cerebral. Es van voler

trobar unes condicions de mort cel·lular que posteriorment ens permetessin testar l'efecte de l'administració de fàrmacs potencialment citoprotectors al cultiu. Per això, es van testar diferents temps d'OGD, amb i sense reoxigenació. L'efecte es va comparar amb cultius sotmesos a normòxia i normoglicèmia durant el mateix període de temps.

No es va observar cap efecte significatiu en quant a la reducció de la viabilitat cel·lular fins a les 16 hores d'OGD (Fig. 2A), que induïa una davallada del $40\pm 5.65\%$ (Fig. 2B), i essent les 24 hores massa tòxic pels cultius ($69.3\pm 5.9\%$). Per a les 16 hores, es van testar diferents temps de reoxigenació i es va observar que els resultats obtinguts no diferien significativament quan els cultius es sotmetien a reoxigenació (resultats no mostrats). Es va establir el model de 16 hores d'OGD sense reoxigenació.

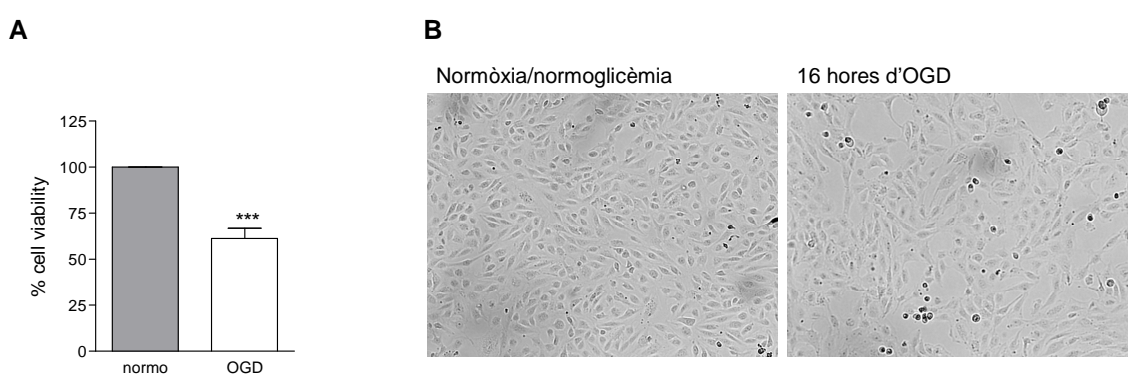


Figura 2. Viabilitat cel·lular de la línia hCMEC/D3 en resposta a la inducció d'OGD durant 16 hores sense reoxigenació (n=8), ***p<0.001 (A). Imatges en camp clar mostrant l'efecte de la OGD sobre les cèl·lules hCMEC/D3 (20X) en aquestes condicions (B).

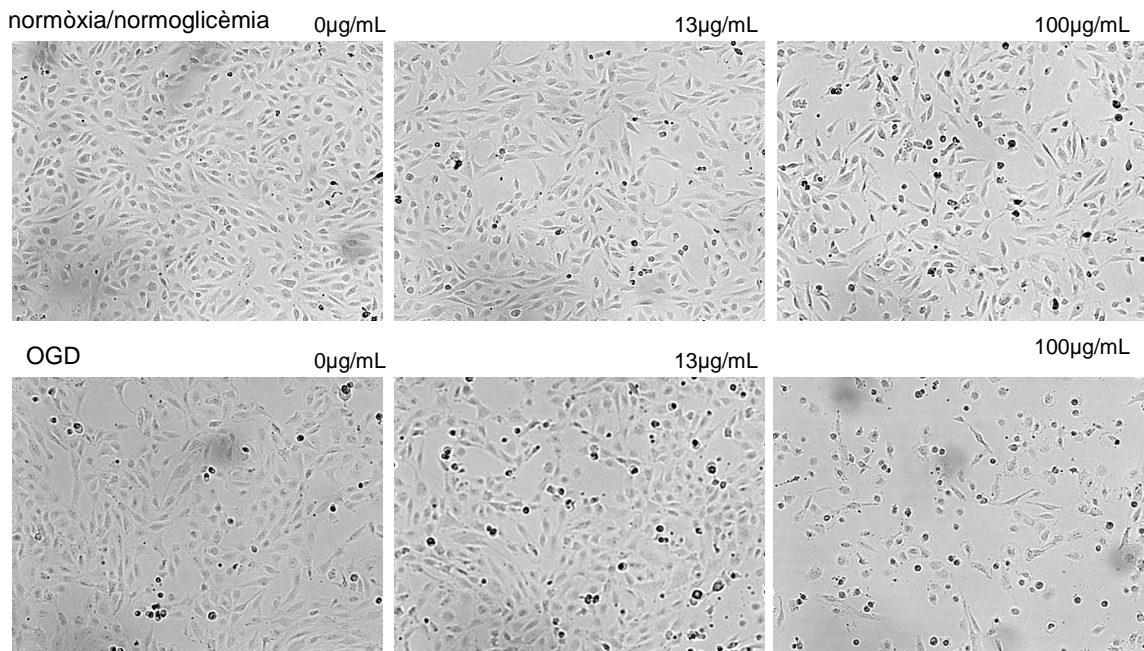
III. Efecte de l'administració d'rtPA durant l'OGD

El següent pas va ser combinar els dos estímuls testats fins al moment; es va administrar rtPA durant l'OGD i es va avaluar la viabilitat dels cultius. El model establert va ser el cotractament amb l'rtPA –dosis 13 i 100µg/mL- durant 16 hores d'OGD, sense deprivació prèvia d'FBS ni reoxigenació.

L'efecte en la viabilitat cel·lular degut a 16 hores d'OGD va ser d'una reducció del $40\pm 5.65\%$. En condicions de normòxia/normoglicèmia, la dosi de 13µg/mL d'rtPA no va induir cap efecte, en canvi 100µg/mL d'rtPA va reduir la viabilitat cel·lular un $25\pm 3.73\%$. En condicions d'OGD, la dosi de 13µg/mL tampoc va induir cap diferència significativa, però en el cas de 100µg/mL d'rtPA es va obtenir una citotoxicitat del $32\pm 3.73\%$ respecte les cèl·lules no tractades però sotmeses a OGD. De fet, per les dues dosis de rtPA avaluades, l'OGD disminuïa la viabilitat cel·lular respecte el seu propi control a la mateixa dosi en condicions de normòxia/normoglicèmia (Fig. 3).

Aquests efectes van ser evidents en l'observació dels cultius, tal i com es pot apreciar en les micrografies de la figura 3B. En normòxia/normoglicèmia s'aprecia l'estat de les cèl·lules no tractades. A la dosi de 100µg/mL de rtPA s'observa visualment un decrement de la confluència cel·lular deguda a la mortalitat induïda pel tractament, així com un increment de cèl·lules mortes desenganxades del substrat, i una pèrdua de la morfologia en moltes d'elles. En cèl·lules sotmeses a OGD, la condició control sense tractar mostra una important reducció de densitat cel·lular, com mostren els resultats del gràfic. La densitat cel·lular no varia en la dosi de 13µg/mL, però es redueix dràsticament en la dosi 100µg/mL. En aquestes condicions, les cèl·lules presenten més alteracions en la seva morfologia, es veuen encogides i apareix un nombre molt més evident de cèl·lules mortes desenganxades del substrat.

A



B

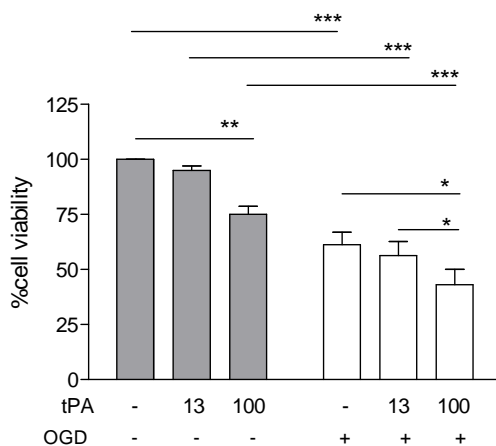


Figura 3. Imatges en camp clar mostrant l'efecte de la combinació dels dos estímuls (20X) (A). Cultius cel·lulars en condicions de normòxia/normoglicèmia i després de 16 hores d'OGD. L'administració d'rtPA es va combinar amb les dues condicions per les dosi 0, 13 i 100µg/mL rtPA (n=11). La viabilitat cel·lular es va determinar per l'assaig de reducció d' MMT (B). Els valors es mostren com el percentatge de la mitja±SEM comparat amb cèl·lules no tractades. (n=6) *p<0.05, **p<0.01,***p<0.001.

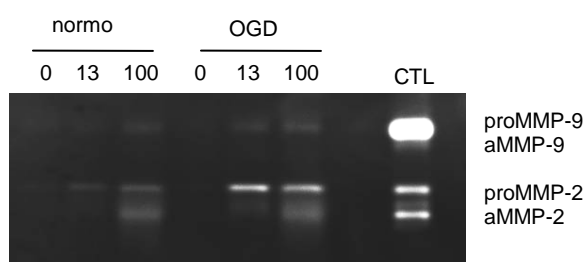
IV. Increment de l'alliberació de MMP2 i MMP-9 en resposta al tractament amb rtPA durant l'OGD.

Dels experiments de l'apartat anterior es van recollir els medis condicionats i es va avaluar l'alliberament de MMP-2 i MMP-9 per Zimografia en gels de gelatina (Fig. 4A).

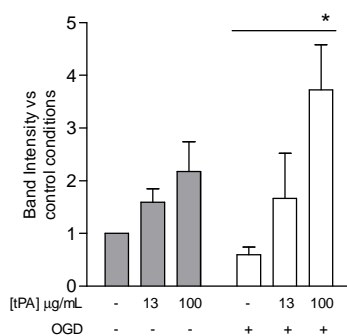
Es va observar un augment de l'expressió depenent de la dosi d'rtPA de la proforma de la MMP-9 (proMMP-9) tant en condicions normòxia/normoglicèmia com en OGD. 16 hores de OGD no induïa cap canvi en l'alliberament de MMP-9 al medi extracel·lular. En canvi, la dosi de 100µg/mL d'rtPA combinada amb l'OGD, va mostrar un augment significatiu respecte el control no tractat (Fig 4B.a). No es va observar increment de l'activació de la MMP-9 sota cap de les condicions experimentals.

En el cas de la MMP-2 l'increment de l'expressió va ser molt superior, tant per la proforma com per la forma activa, que l'observat en el cas de la proMMP-9. L'increment també depenia de la dosi d'rtPA administrat, tant en condicions d'OGD com de normòxia/normoglicèmia. Una vegada més, 16 hores de OGD sense rtPA tampoc va ser capaç d'induir un canvi en l'alliberament de proMMP-2 o MMP-2 activa al medi extracel·lular. Els nivells de pro-MMP2 després del tractament amb rtPA en condicions de normòxia/normoglicèmia no van ser diferents que els corresponents en condicions d'OGD (Fig 4B.b). En canvi, els nivells de MMP-2 activa van ser significativament superiors per les dues dosis de rtPA tant en normòxia/normoglicèmia com en OGD. A més, l'increment observat en la dosi de 100µg/mL rtPA en OGD va ser significativament superior a l'increment de la mateixa dosi en normòxia/normoglicèmia (Fig. 4B.c).

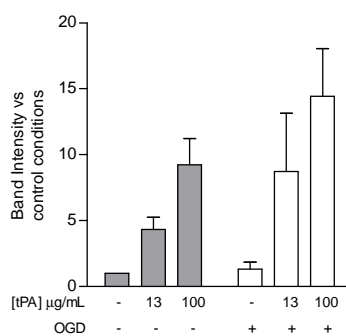
A.



B. a.



b.



c.

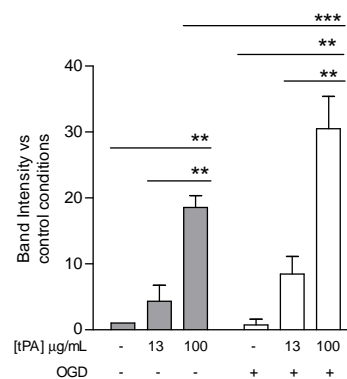


Figura 4. Zimografia representativa mostrant els efectes de l'administració de tPA en cèl·lules sotmeses a condicions normòxia/normoglicèmia o d'OGD en quant als nivells d'alliberació de Gelatinases (A). Anàlisi de Zimografia en Gelatina per les proformes i formes actives de MMP-2 i MMP-9 presents als sobrenedants dels cultius després dels diferents tractaments amb rtPA combinats OGD. (B). Quantificació de la intensitat de les bandes corresponents a les proformes de MMP-9 (a), i MMP-2 (b), i a la forma activa de la MMP-2 (c) normalitzat pel control positiu (CTL) de la proforma MMP-2 i expressat en tant per 1 de la intensitat de les cèl·lules no tractades, de cada experiment independent (n=4) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

V. Administració de Dipyridamole (DP) a cèl·lules endotelials en cultiu

Un cop es van establir els efectes tòxics de la inducció d'OGD i tractament amb rtPA sobre els cultius, es va procedir a testar els possibles efectes d'un fàrmac del qual es volien avaluar les seves possibilitats com a citoprotector; el Dipyridamole (DP). El primer pas va ser testar l'efecte del DP per si sol i en condicions normòxia/normoglicèmia sobre els cultius. Es va dissenyar una corba de dosis i es van realitzar els assaigs de viabilitat i toxicitat cel·lular, reducció d'MTT i alliberament de LDH. En cap dels casos es van observar diferències significatives en la resposta al tractament amb DP (Fig. 5). Es va triar la dosi de 10µg/mL de DP per als posteriors tractaments combinant els dos fàrmacs. En aquesta dosi el vehicle corresponent (àcid tartàric) no va induir cap efecte en la viabilitat cel·lular.

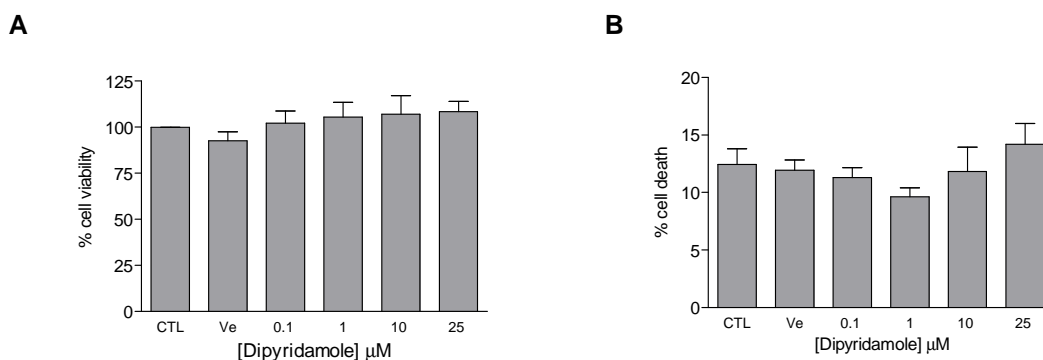


Figura 5. Quantificació de la viabilitat cel·lular en resposta a l'administració de DP determinada per assaigs d' activitat MTT **(A)** i LDH **(B)**. Els valors es mostren com el percentatge de la mitjana \pm SEM respecte cèl·lules no tractades. Els valors obtinguts son el resultat d'experiments realitzats de forma independent (n= 5).

VI. Efecte del tractament amb Dipyridamole sobre la reducció de viabilitat cel·lular induïda per l'administració d'rtPA durant l'OGD

Un cop conegut que el DP no produïa cap efecte per si sol en quant a la viabilitat cel·lular en el nostre model, es va voler avaluar el seu efecte en les condicions establertes d'administració d'rtPA durant l'OGD. Per als tractaments, el DP es va testar a diferents temps en relació a l'estímul de rtPA durant la OGD. Aquests "time-frames" van ser establerts en funció del moment d'administració del DP: abans de la OGD (pre-tractament), durant (co-tractament) o després d'aquesta (post-tractament).

Pel que fa a la reducció de la viabilitat deguda només a l'OGD, en el cas del co-tractament i el post-tractament es va observar una reducció del $30\pm 3.6\%$ i $30\pm 4.3\%$ respectivament en ambdós casos. En el pre-tractament la reducció va ser només d'un $23\pm 6.64\%$ (Fig. 6).

En el pre-tractament no es van observar diferències significatives entre cap de les condicions, tot i la lleugera davallada en la viabilitat cel·lular quan es tractava amb $100\mu\text{g/mL}$ d'rtPA, ja fos combinat amb el DP com amb el seu vehicle (Fig. 6A),.

En el co-tractament, i com s'havia obtingut anteriorment, en condicions de normòxia/normoglicèmia es va observar novament una reducció de la viabilitat cel·lular deguda a l'administració d'rtPA en la dosi $100\mu\text{g/mL}$. En l'OGD, la reducció de la viabilitat per $100\mu\text{g/mL}$ d'rtPA va resultar més acusada, sent significativa la diferència respecte els controls. En cap cas el tractament amb DP va resultar significativament diferent a la corresponent condició amb vehicle (Fig. 6B).

En el post-tractament, en la condició de normòxia/normoglicèmia, es va observar novament la reducció de la viabilitat cel·lular deguda a l'administració de rtPA que, tampoc va mostrar canvis quan es va combinar amb DP. En condicions d'OGD, la reducció de la viabilitat rtPA $100\mu\text{g/mL}$

d'rtPA ve ser també més acusada i significativa respecte els controls. Quan es va administrar el DP, aquesta reducció va deixar de ser significativa (Fig 6C).

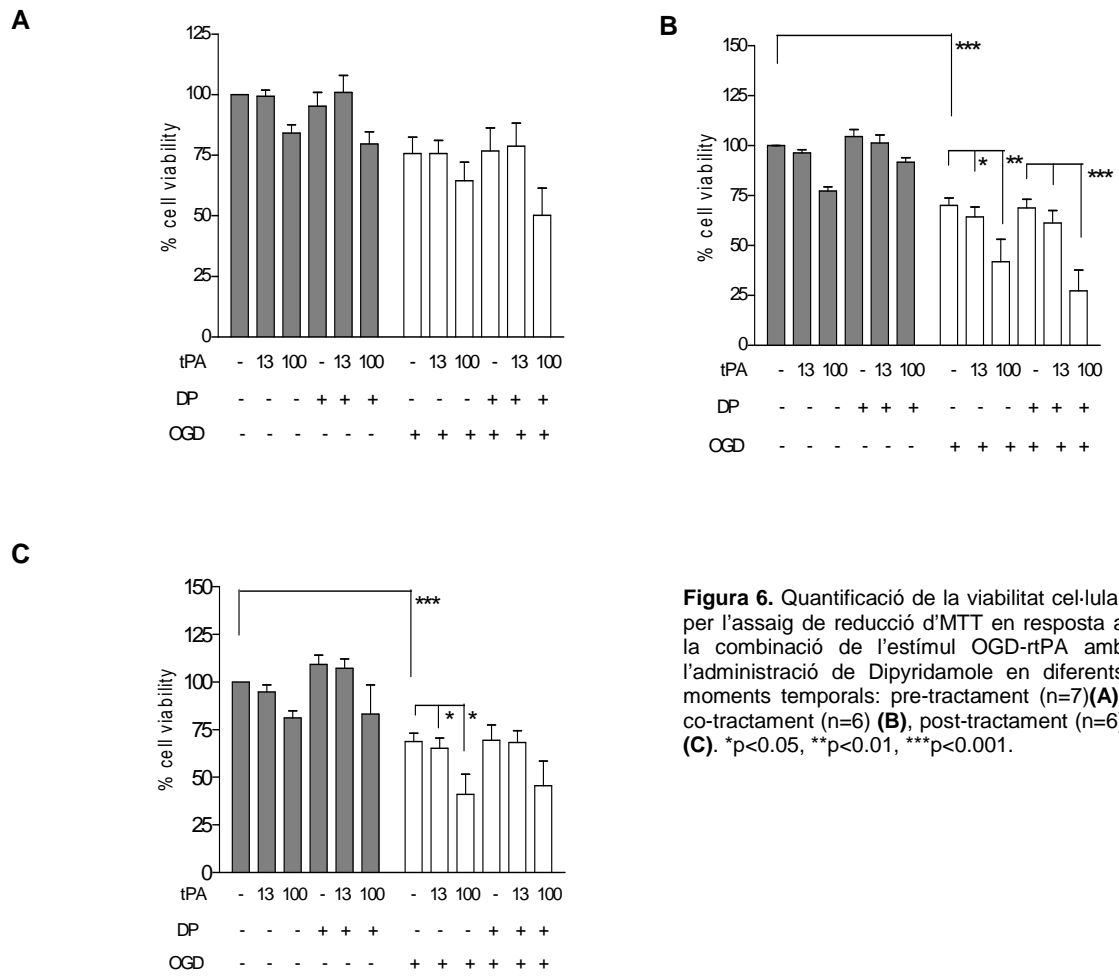


Figura 6. Quantificació de la viabilitat cel·lular per l'assai de reducció d'MTT en resposta a la combinació de l'estímul OGD-rtPA amb l'administració de Dipyridamole en diferents moments temporals: pre-tractament (n=7)(A), co-tractament (n=6) (B), post-tractament (n=6) (C). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

DISCUSSIÓ

L'ús de l'rtPA en el tractament de l'ictus isquèmic en fase aguda es troba limitat a les primeres quatre hores i mitja des de l'inici dels símptomes (Hacke et al., 2004). Una de les majors preocupacions és el risc de transformació hemorràgica, que patiran entre un 5-6% dels pacients tractats amb el trombolític (Adams et al., 1993). Un altre problema del tractament trombolític són els aproximadament 60% de pacients d'ictus els quals, tot i haver estat diagnosticats a temps i tenir signes de teixit potencialment salvable, no respondran de forma òptima al tractament i no es donarà la reperfusió de l'artèria obstruïda. En aquests pacients, s'ha postulat que les possibles accions neurotòxiques de l'rtPA poden empitjorar el dany produït per la isquèmia cerebral (The IMS Study Investigators, 2004 i Hill et al., 2002). De fet, existeix una creixent evidència sobre els efectes neurotòxics de l'rtPA (Wang et al., 1998; Benchenane et al., 2004 i Suzuki, 2010).

El tPA endogen és sintetitzat i alliberat per cèl·lules flanquejants del sistema vascular. Exerceix una acció protectora al cervell en condicions d'isquèmia mitjançant la seva acció trombolítica (Tabrizi et al., 1999). Si el tPA endogen no pot llisar el trombus per si sol, l'administració exògena d'rtPA pot resoldre la fibrinòlisi del clot. Si l'rtPA resulta inefectiu i la isquèmia es prolonga, existeix el risc que entri al cervell a través de la BHE compromesa i malmeti la unitat neurovascular i el parènquima cerebral (Benchenane et al., 2005). A més, el tPA té altres accions al cervell. Entre elles, activa els receptors NDMA, amplifica la conductància al Ca^{2+} , activa proteases extracel·lulars com les MMPs, especialment la MMP-9, i té activitat proteasa d'ampli espectre, exercint accions sobre la UNV. Aquests efectes incrementen l'excitotoxicitat, malmeten la integritat de la BHE, i poden causar edema i hemorràgia cerebral (Nicole et al., 2001 i Bechenane et al., 2004). S'ha observat que animals deficients en tPA tenen incrementats els dipòsits de fibrina, els quals poden malmetre el cervell, fet que es correlaciona amb un increment del dany cerebral. (Tabrizi et al., 1999).

Degut a la gran complexitat i heterogenicitat dels sistemes cel·lulars presents al sistema nerviós central dels mamífers, es requereixen estratègies d'estudi simples. Els models cel·lulars *in vitro*, tot i que no poden reproduir les complexes interaccions que tenen lloc al cervell *in vivo*, ofereixen una estratègia bàsica d'aproximació que pot ajudar-nos a obtenir respostes. Aquests sistemes permeten un major control de les variables que influeixen en la lesió produïda, a més del seu baix cost econòmic (Prieto-Arribas et al., 2008). El nostre estudi s'ha basat en un model cel·lular *in vitro* en el que vam incubar els cultius de cèl·lules endotelials cerebrals humanes en medis sense oxigen ni glucosa, per reproduir la interrupció de l'aport d'oxigen i nutrients durant un episodi isquèmic. En aquestes condicions vam administrar el tractament trombolític rtPA als cultius per simular l'efecte del tPA exògen sobre les cèl·lules endotelials cerebrals, les quals tenen un paper clau en la formació de la BHE i la unitat neurovascular.

En primer lloc, l'administració d'rtPA va induir una reducció del metabolisme cel·lular dosi-depenent (Fig.1A). Aquesta disminució va ser deguda a un increment de la citotoxicitat induïda per l'rtPA, com vam comprovar amb l'assaig d'LDH (Fig.1B). Com era d'esperar i ja s'havia descrit per altres tipus cel·lulars endotelials (Acosta i Li, 1979; Graven et al., 1993 i Andjelkovic et al., 2003) , 16 hores de manteniment dels cultius en OGD van induir una reducció important de la viabilitat cel·lular (Fig. 2A).

La toxicitat del tPA ja havia estat descrita en models *in vitro* de diferents tipus cel·lulars. En neurones corticals de rata, s'havia observat que el tPA amplificava la mort cel·lular induïda per la hemoglobina (Wang et al., 1999). El tractament amb diferents inhibidors del tPA, protegia les neurones de la mort induïda per l'excitotoxicitat a través del receptor NMDA (Docagne et al., 2002 i Liot et al., 2004). Per examinar la implicació directa de l'rtPA en la neurotoxicitat, es van injectar dosis creixents d'rtPA a l'escorça cerebral de rates i els resultats van mostrar canvis necròtics en neurones, pèrdua d'integritat de la BHE i degradació de la làmina basal (Goto et al., 2007). En canvi, en un altre estudi cèl·lules endotelials cerebrals en cultiu es va descriure que l'administració d'rtPA fins a dosi de 20µg/mL no induïa cap efecte citotòxic (Wang et al., 2003). Nosaltres hem pogut comprovar aquests mateixos resultats i, a més, hem demostrat que per sobre de 50µg/mL l'rtPA resulta tòxic en el nostre model, i que aquesta toxicitat incrementa de forma dosi-depenent (Fig. 1). En estudis més complexes, també s'ha observat que l'efecte del tPA incrementant la obertura de l'endoteli induïda per hipòxia-reoxigenació (Hiu et al., 2008). Així doncs, actualment disposem d'eines adequades per poder estudiar i esclarir els efectes citotòxics del rtPA sobre diferents tipus cel·lulars.

En combinar l'administració d'rtPA durant la OGD, vam observar que els dos estímuls incrementaven la toxicitat de forma sumativa, però no de forma sinèrgica. És a dir, l' OGD no potenciava el dany produït per l'rtPA en el nostre model (Fig. 3B). De fet, els nostres resultats corroboren el treball anterior de Liu i col·laboradors (2004), on demostren que el tPA potencia l'apoptosi en endoteli humà sotmès a isquèmia.

Per altra banda, també vam observar un increment de l'alliberació de Gelatinases dosi-depenent que augmentava de forma sumativa però no sinèrgica sota condicions d'OGD. En el nostre estudi les formes incrementades corresponen a la proMMP-9, proMMP-2 i la aMMP-2. No vam observar cap increment en la MMP-9 activa. La intensitat de la forma activa de la MMP-2 va resultar molt superior a la de les altres dues formes analitzades (Fig. 4). Aquestes observacions van indicar que l'administració dosi creixents d'rtPA al cultiu de cèl·lules endotelials sotmeses a OGD produeix un increment en els nivells de proMMP-9, proMMP-2 i aMMP-2 que a l'hora es correlaciona amb els resultats observats en quant a la reducció de viabilitat dels cultius. En estudis realitzats en cultiu de cèl·lules endotelials cerebrals humanes, ja s'havia descrit que l'administració de tPA produïa un increment de l'alliberació de les formes actives d'ambdues Gelatinases al medi (Wang et al., 2003 i Lee et al., 2007). S'ha fet especial

èmfasi en l' increment de MMP-9 induït per l'administració d'rtPA. Aquest s'ha observat en astròcits corticals de rata (Wang et al., 2006), cèl·lules endotelials (Wang et al, 2003 and Eng et al, 2003), així com també en models d'isquèmia *in vivo* (Tsuji et al, 2005) i en neutròfils humans cultivats *ex-vivo* (Cuadrado et al., 2008). En el nostre estudi es demostra de forma clara i evident que les cèl·lules endotelials també incrementen l'alliberació de MMP-2 després de l'administració d'rtPA durant l'OGD.

Basant-nos en els efectes deleteris observats en estudis *in vivo* i *in vitro*, i els estrictes criteris d'inclusió per a l'administració del tPA en pacients han sofert un ictus isquèmic, la pregunta de si aquesta estratègia terapèutica es pot millorar es manté encara oberta. Per optimitzar l'eficàcia del tractament trombolític s'han provat diverses molècules potencialment neuroprotectores que encara no han assolit l'aprovació clínica per a la seva aplicació en la clínica (Kindwell et al., 2001 i De Keyser et al., 1999). La millora de l'eficàcia passaria per disminuir l'efecte secundari principal, la transformació hemorràgica, i evitar la possible neurotoxicitat del fàrmac. De fet, l'estudi de la combinació de teràpies coadjuvants està sent un gran repte per la investigació neurovascular (Vivien et al, 2004). La major dificultat per les estratègies de combinació es triar-ne l'adequada i en la convenient finestra terapèutica, així com aconseguir un mecanisme d'acció que produeixi un efecte sinèrgic més que un efecte sumatiu entre els fàrmacs.

En aquest sentit, i donat que la isquèmia i reperfusió indueixen respostes inflamatòries en les cèl·lules endotelials que contribueixen a la patofisiologia de l' ictus (Lee SR, 2004), en el present estudi ens vam proposar avaluar si en aquest tipus cel·lular, el tractament amb *Dypiridamole* (DP) podia revertir la citotoxicitat induïda per l'administració d'rtPA en condicions de privació d'oxigen i glucosa.

El DP és un agent usat de forma comú en la prevenció secundària de l'ictus per les seves propietats antiplaquetars (Patrono et al, 2001). A més d'aquesta propietat, existeixen evidències d'efectes del DP en la fase aguda o subaguda de l'ictus. En models *in vivo* d'isquèmia cerebral focal i reperfusió amb rtPA, el pretractament amb DP protegeix el cervell isquèmic incrementant el flux cerebral, reduint els dèficits de reperfusió, protegint la zona infartada del dany neuronal i reduint el volum d'infart (Aldandashi et al., 2007 i Kim et al., 2008). En diversos estudis *in vitro* han aprofundit en els mecanismes que exerceix el DP. S'ha vist la seva eficàcia rescatant del dany neuronal i s'ha proposat com a possible agent neuroprotector en la fase aguda o subaguda per les seves propietats antiinflamatòries i antioxidants (Farinelli et al, 1998; Blake et al, 2003; Chakrabarti et al, 2005 i Eisert et al, 2005). En neurones en cultiu l'administració de DP preveu la mort neuronal de forma dosi-depenent (Farinelli et al., 1998 i Blake et al., 2003 i Yamagata et al., 2004). En cèl·lules endotelials disminueix la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), accions que podrien promoure la protecció i millora de la funció vascular (Chakrabarti, 2005). A més, s'ha vist que bloqueja l'adhesió de neutròfils a les

cèl·lules endotelials activades (Hallevi H, 2007). També modula l'expressió de gens pro inflamatoris en cultius primaris de plaquetes i monòcits humans, a més d'atenuar la síntesi i l'activació de MMP-9 en monòcits activats (Weyrich AS, et al. 2005).

En el nostre model, el tractament amb DP en condicions normals no produeix cap efecte pel que fa a la toxicitat i al metabolisme de les cèl·lules (Fig. 5). Per a la coadministració del DP amb l'rtPA en condicions d'OGD, ens vam plantejar quin seria el millor moment per a la seva administració en relació al rtPA a nivell clínic. Tot i així, en cap dels moments temporals i sota cap de les dosi de tPA vam poder observar un efecte de recuperació de la viabilitat cel·lular respecte el tractament amb el seu vehicle (Fig. 6). En contra de l'esperat i a diferència d'altres treballs en cèl·lules endotelials, on l'administració de DP sota condicions d'OGD protegeix lleugerament de la mort cel·lular (Guo et al., 2010), en els nostres experiments el DP no mostra aquest efecte. En cultius neuronals el DP també disminueix la mort neuronal de forma dosi-dependent (Farinelli et al., 1998 i Blake et al., 2003). A més, en plaquetes i cèl·lules endotelials, el DP exerceix un efecte protector mitjançant propietats antioxidants (Chakrabarti et al., 2005).

Tot i que en el nostre model no observem que el tractament amb el DP produeixi una millora en l'assaig de viabilitat cel·lular, podria ser que la seva administració reverteixi altres canvis moleculars que s'han induït tant per la OGD com per tractament amb tPA. Un exemple, seria l'expressió de certes molècules inflamatòries. De fet, en altres estudis s'ha demostrat que el DP es capaç de reduir l'increment d'expressió de ICAM-1 i VCAM-1 induïda per l'administració de TNF α . Aquest mateix treball demostra que el DP es capaç de reduir l'increment d'expressió de MMP-9 induït pels estímuls inflamatoris i estrès metabòlic. Aquest estudi aporta evidències de la implicació del DP en la millora de la resposta de l'endoteli a estímuls metabòlics i d'estrès (Guo et al., 2010). És per això que, actualment estem treballant per avaluar l'efecte del tractament amb DP en l'alliberació de Gelatinases en el nostre model de tractament de tPA durant les 16h de OGD. Volem comprovar si el DP es capaç de revertir l'increment en l'alliberació de MMP-2 i MMP-9 en alguna de les condicions avaluades fins a dia d'avui.

També seria interessant estudiar si el DP és capaç de produir algun efecte a temps més curts d'OGD, tant pel que fa a la viabilitat i toxicitat cel·lular, com en l'alliberació de Gelatinases. Una possible explicació seria que la inducció d'una OGD tan prolongada pot produir un dany ja irreversible en les cèl·lules. Seria interessant comprovar si el DP pot estar influint en els processos que es donen de forma més primerenca. D'altra banda, ens hem de plantejar si el mètode de reducció d'MTT, que hem utilitzat per avaluar la mort cel·lular, és suficient per descartar un possible efecte beneficiós del DP sobre els estímuls tòxics assajats. Aquest mètode (Mosmann et al., 1983), dóna una mesura de l'estat del metabolisme mitocondrial, i sabem que davant determinats estímuls les cèl·lules poden optar per reduir el seu metabolisme com a mecanisme per prevenir la seva mort. Creiem que seria interessant avaluar si estem induint estímuls que produeixen una mort per necrosi o apoptosi (Guo et al., 2010). Per això

estem realitzant assaigs més específics per tal d'avaluar si l'administració de DP tan sols és capaç de revertir un sol tipus de mort.

Hem de remarcar que el nostre estudi presenta les limitacions pròpies dels models cel·lulars *in vitro*. Aquests són models simples que es donen sovint informació parcial que és difícil interpretar i extrapolar a models *in vivo*. De fet, el nostre model es centra en un sol tipus cel·lular, i no té en compte totes les interaccions que tenen lloc entre els diferents tipus cel·lulars que configuren la UNV i el parènquima cerebral. Tot i així constitueix una bona eina per aproximar-nos de forma més senzilla i reproduïble als processos que tenen lloc de forma específica en un determinat tipus cel·lular. Per altra, les condicions experimentals són molt fàcilment modificables, podent així testar gran varietat de condicions i permetent-nos triar les més òptimes per estudiar en models *in vivo*.

CONCLUSIONS

- La dosi de rtPA usada en el tractament trombolític en humans (13µg/mL) no redueix la viabilitat dels cultius cel·lulars endotelials de forma significativa administrat durant 16 hores. A partir de la dosi de 50µg/mL i fins a 100µg/mL, l'rtPA resulta tòxic, sent la reducció de la viabilitat cel·lular observada dosi-depenent.
- La inducció de 16 hores d' OGD és tòxica al cultiu cel·lular endotelial.
- L'administració d'rtPA durant l'OGD (5%CO₂, 95%N₂, 0'5%O₂) produeix un efecte sumatiu en la mort cel·lular induïda per ambdós estímuls.
- L'administració d'rtPA produeix un increment dosi-depenent de l'alliberació de Gelatinases. Les formes que es veuen incrementades són la proMMP-9, proMMP-2 i la aMMP-2. En combinar l'administració del fàrmac amb l'estímul isquèmic s'observa un increment respecte les condicions de normòxia/normoglicèmia, especialment en quant a l'alliberament de MMP-2 activa.
- Dosi creixents de DP fins a 25µM no indueixen cap efecte en la viabilitat dels cultius.
- L'administració de DP en diferents moments temporals no mostra cap efecte pel que fa a la recuperació de la citotoxicitat induïda pel tractament amb rtPA tant quan aquest s'administra en condicions normòxia/normoglicèmia com en OGD.

REFERÈNCIES

A

- Abilleira S, Montaner J, Molina C A, Monasterio J, Castillo J, Alavarez-Sabín J, Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. 2003. J Neurosurg 99:65-70.
- Acosta D, Li CP. Injury to primary cultures of rat heart endothelial cells by hypoxia and glucose deprivation. In Vitro. 1979 Nov;15(11):929-34.
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. Stroke. 1993; 24: 35-41.
- Akopov SE, Simonian NA, Gregorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. Stroke. 1996.;27:1739-17-43.
- Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Keep RF. The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro. J Cereb Blood Flow Metab. 2003 Nov;23(11):1348-55.
- Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. BMJ 1994;81-106.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, 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 Dec;20(12):1681-9.
- Asano T, Ochiai Y, Hidaka H. Selective inhibition of separated forms of human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase by platelet aggregation inhibitors. Mol Pharmacol. 1977 May;13(3):400-6.

B

- Baldwin K, Orr S, Briand M, Piazza C, Veydt A, McCoy S. Acute ischemic stroke update. 2010. Pharmacotherapy. 30(5):493-514.
- Baranes D, Lopez-Garcia JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1996) Reconstitution of the hippocampal mossy fiber and associational-commisural pathways in a novel dissociated cell culture system. Proc Natl Acad Sci USA 93:4706-4711.
- Barnett HJ. Forty years of progress in stroke. Stroke. 2010 Jun;41(6):1068-72.
- Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck M-P, Cecchelli R, Vivien D, Touzani O, Ali C. Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. Stroke 2005;36;1059-1064.

- Benchenane K, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Touzani O, Vivien D. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci.* 2004 Mar;27(3):155-60. Review.
- Best LC, McGuire MB, Martin TJ, Preston FE, Russell RG. Effects of epoxymethano analogues of prostaglandin endoperoxides on aggregation, on release of 5-hydroxytryptamine and on the metabolism of 3',5'-cyclic AMP and cyclic GMP in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1979 Mar 22;583(3):344-51.
- Blake AD. 2003. Dipyridamole is neuroprotective for cultured rat embryonic cortical neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324(2004) 501-504.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochem Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):55-71.

C

- Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2009 Feb 6;158(3):983-94. Epub 2008 Jun 19.
- Carine Ali et al., Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood-Brain-Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process. *Stroke* 2005;36;1059-1064.
- Castillo J, Rodriguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis* 2004;17 Suppl 1:7-18.
- Chakrabarti S, Vitseva O, Iyu D, Varghese S, Freedman JE. The effect of Dipyridamole on Vascular Cell-Derived Reactive Oxygen Species. 2005. *JPET* 315:494-500,2005.
- Chamorro A, Planas AM. Inflammation-mediated damage as a potential therapeutic target in acute ischemic stroke. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2004;47:185-204.
- Chang DI, Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Abumaiya T, Mazar AP, del Zoppo GJ. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1408-1419.
- Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett.* 1997; 238: 53–56.
- Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamón M, Penalba A, Fernández-Cádenas I, Rosell A, Montaner J. Tissue plasminogen activator (tPA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J. Leukoc. Biol.* 84:207-214;2008.
- Cuadrado E, Rosell A, Penalba A, Slevin M, Alvarez-Sabín J, Ortega-Aznar A, Montaner J. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human

brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study. *J Proteome Res.* 2009 Jun;8(6):3191-7.

D

- Davies BJ, Pickard BS, Steel M, Morris RG, Lathe R. Serine proteases in rodent hippocampus. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4;273(36):23004-11.
- Diener HC. Dipyridamole trials in stroke prevention. *Neurology* 1998;51:S17—9.
- Docagne F, Nicole O, Gabriel C, Fernández-Monreal M, Lesné S, Ali C, Plawinski L, Carmeliet P, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Smad3-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 in astrocytes mediates neuroprotective activity of transforming growth factor-beta 1 against NMDA-induced necrosis. *Mol Cell Neurosci.* 2002 Dec;21(4):634-44.

E

- Eisert WG. Dipyridamole.
- Eng H. Lo, Aoki T, Sumii T, Mori R, Wang X. Spontaneously Hypertensive Rats During Reperfusion Injury: Mechanical Versus Embolic Focal Ischemia in Blood-Brain Barrier Disruption and Matrix Metalloproteinase-9 Expression. *Stroke* 2002;33;2711-2717
- Eng.H.Lo, Sumii T. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation alter embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33. 2002;831-836.

F

- Farinelli SE, Greene LA, Friedman WJ. 1998. Neuroprotective Actions of Dipyridamole on Cultured CNS Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 18(14):5112-5123.
- Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Lèveillé F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A, Vivien D. Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci.* 2004 Apr;25(4):594-601.
- Ferrer I, Fríguls B, Dalfó E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase independent signaling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29:472-481.
- Figueredo VM, Diamond I, Zhou H-Z, Camacho SA. Chronic dipyridamole therapy produces sustained protection against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277:2091-2097,1999.
- Flavin MP, Zhao G, Ho LT (2000) Microglial tissue plasminogen activator triggers apoptosis in Vitro. *Glia* 29:347-354.
- Frijins CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2002; 33:2115-22.

- 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 Res.* 1999;842:92-100.
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr., del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.* 2004;35:998-1004.

G

- Gao F, Sugita M, Nukui H. Phosphodiesterase 5 inhibitor, zaprinast, selectively increases cerebral blood flow in the ischemic penumbra in the rat brain. *Neurol Res.* 2005 Sep;27(6):638-43.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1020-1028.
- Goto H, Fujisawa H, Oka F, Nomura S, Kajiwara K, Kato S, Fujii M, Maekawa T, Suzuki M. Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain. *J Neurotrauma.* 2007 Apr;24(4):745-52.
- Graven KK, Zimmerman LH, Dickson EW, Weinhouse GL, Farber HW. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. *J Cell Physiol.* 1993 Dec;157(3):544-54.
- Guo S, Stins M, Ning M, Lo EH. Amelioration of inflammation and cytotoxicity by dipyridamole in brain endothelial cells. *Cerebrovasc Dis.* 2010 Aug;30(3):290-6. Epub 2010 Jul 23.

H

- Hacje W, et al. 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363,768-774.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008 Sep 25;359(13):1317-29.
- Hallevi H, Hazan-Halevy I, Paran E. Modification of neutrophil adhesion to human endothelial cell line in acute ischemic stroke by dipyridamole and candestran. *Eur J Neurol* 2007;14:1002-1007.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1998. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119,203-10.

- Hatcher JF, Adibhatla RM. Tissue Plasminogen Activator (tPA) and Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Stroke: Therapeutic Strategies. 2008 CNS Neurol Disord Drug Targets. 7(3):243-253.
- HeoJH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1999;19:624-633.
- Hernández-Guillamon M, Delgado P, Ortega L, Pares M, Rosell A, García-Bonilla L, Fernández-Cadenas I, Borrell-Pagès M, Boada M, Montaner J. Neuronal TIMP-1 release accompanies astrocytic MMP-9 secretion and enhances astrocyte proliferation induced by beta-amyloid 25-35 fragment. J Neurosci Res. 2009 Jul;87(9):2115-25.
- Herz J, Strickland DK (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J clin Invest 108:779-784.
- Hill MD, Barber PA, Demchuk AM, Newcommon NJ, Cole-Haskayne A, Ryckborst K, Sopher L, Button A, Hu W, Hudon ME, Morrish W, Frayne R, Sevick RJ, Buchan AM (2002) Acute intravenous-intra-arterial revascularization therapy for severe ischemic stroke. Stroke 33:279-282
- Hiu T, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Kawakubo J, Honda M, Suyama K, Nagata I, Niwa M. Tissue plasminogen activator enhances the hypoxia/reoxygenation-induced impairment of the blood-brain barrier in a primary culture of rat brain endothelial cells. Cell Mol Neurobiol (2008) 28:1139-1146.

I

- IMS Study Investigators, The. Combined intravenous and intraarterial recanalization for acute ischemic stroke: the Interventional Management of Stroke Study. Stroke. 2004;35:904-911.
- Iuliano L, Colavita AR, Camastra C, Bello V, Quintarelli C, Alessandrini M, Piovella F, Violi F. Protection of low density lipoprotein oxidation at Chemicals and cellular level by the antioxidant drug dipyridamole. Br J Pharmacol. 1996;119:1438-1446.
- Iuliano L, Ghiselli A, Alessandri C. Superoxide anion scavenging property of dipyridamole. Thromb Haemost. 1989;61:149.
- Iuliano L, Piccheri C, Coppola I, Praticò D, Micheletta F, Violi F. Fluorescence Quenching of dipyridamole associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. Biochem Biophys Acta. 2000;1474:177-182.
- Iuliano L, Violi F, Pedersen JZ, Praticò D, Rotilio G, Balsano F. Free radical-mediated platelet activation by haemoglobin released from red blood cells. Arch Biochem Biophys. 1992;299:220-224.

J

- Jeong A. Kim, Nam D. Tran, Weilin Zhou, Mark Fisher. Dipyridamole enhances tissue plasminogen activator release by brain capillary endothelial cells. *Thrombosis research*. 2005;115:435-438.
- Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1430-1440.

K

- Keiser J. et al., Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci*. 22 (1999), pp. 535-540.
- Kim HH, Sawada N, Soydan G, Lee HS, Zhou Z, Hwang SK, Waeber C, Moskowitz MA, Liao JK. Additive effects of statin and dipyridamole on cerebral blood flow and stroke protection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Jul;28(7):1285-93. Epub 2008 Apr
- Kim JA, Tran ND, Zhou W, Fisher M. 2004. Dipyridamole enhances tissue plasminogen activator release by brain capillary endothelial cells. *Thrombosis research*. 115,435-438.
- Kindwell CS, Liebeskind DS, Starkman S, Saver JL. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century. *Stroke*. 2001;32(6):1349-59.
- Krystosek A, Verrall S, Seeds NW. Plasminogen activator secretion in relation to Schwann cell activities. *Int J Dev Neurosci*. 1988;6(5):483-93.

L

- Larrue V, Von Kummer, RV, Höxter G, Bluhmki E, Manelfe C, Regesta G, Bès A. Predictors of hemorrhagic transformations in the ECASS trial. *Cerebrovasc Dis*. 6(1996);175-194.
- Lee SR, Guo SZ, Scannevin RH, Magliano BC, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. 2007. Induction of matrix metalloproteinase, cytoquines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* 417,1-5.
- Lee SR, Wang X, Tsuji K, Lo EH. Extracellular proteolytic pathophysiology in the neurovascular unit after stroke. *Neurol Res*. 2004 Dec;26(8):854-61.
- Liot G, Benchenane K, Léveillé F, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Ruocco A, Mackenzie ET, Buisson A, Ali C, Vivien D. 2,7-Bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both in vitro and in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Oct;24(10):1153-9.
- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1379-83. Epub 2004 Oct 31.

- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12):1379-83. Epub 2004 Oct 31.
- Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke.* 2004 Feb;35(2):354-6.

M

- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990;6:121-125.
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angeles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA and Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. 2001. *Stroke.* 32,1759-66.
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003 Feb 4;107(4):598-603.
- Montaner J., R.-Y. M., Castellanos M., Alvarez-Sabin J, Castillo J. 2005. Molecular signatures of course and prognosis of intracerebral hemorrhage. *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke* 5, 178-188.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65 (1-2): 55–63.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1163-1172.

N

- Nagai N, Yamamoto S, Tsuboi T, Ihara H, Urano T, Takada Y, Terakawa S, Takada A (2001) Tissue type plasminogen activator is involved in the process of neuronal death by oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:631-634.
- Nagasae H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274,21491-4.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, The. Tissue plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 1995; 333:1581-1588.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):59-64.
- Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 2001;69:369-81.

O

- Obrenovitch TP. The ischemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovascular and brain Metabolism Reviews*.1995:267-323.
- Overall CM, Lopez-Otin C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2,657-72.

P

- Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2001 Jan;119(1 Suppl):39S-63S.
- Pettigrew LC. Antithrombotic drugs for secondary stroke prophylaxis. *Pharmacotherapy*. 2001 Apr;21(4):452-63.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol* 2008; 47: 414-26.
- Pulgarín JA, Alañón Molina A, Fernández López P. Phosphorimetric Determination of Dipyridamole in Pharmaceutical Preparations. 1997; 122:253-258.

R

- Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE. Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci*. 1999 Nov;112 (Pt 22):4007-16.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamón M, Lo EH, Montaner J. 2008. 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*;39:1121-1126.
- Rosell A, Foerch C, Murata Y, Lo EH. Mechanisms and markers for hemorrhagic transformation after stroke. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;105:173-8.
- Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006;37(6):1399-406.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998;29(10):2189-95.
- Rosenberg GA, Pfefferkorn T. Closure of the blood-brain-barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke*. 2003;34:2025-2030.

- Runchey S, McGee S. Does this patient have a hemorrhagic stroke?: clinical findings distinguishing hemorrhagic stroke from ischemic stroke. *JAMA*. 2010 Jun 9;303(22):2280-6.

S

- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest*. 1993 Aug;92(2):679-85.
- Selley ML, Czeti AL, McGuinness JA, Ardlie NG. Dipyridamole inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. 1994. *Atherosclerosis* 111:91-97.
- Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhom DE. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20: 1011-1032.
- Sloan MA. Thrombolysis and stroke. Past and future. *Arch Neurol*. 1987 Jul;44(7):748-68.
- Stephen E. Farinelli, Lloyd A. Greene, Wilma J. Friedman. 1998. Neuroprotective Actions of Dipyridamole on Cultured CNS Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 18(14):5112-5123.
- Strbian D, Karjalainen-Lindsberg M-L, Petri T. Mast Cell Stabilization Reduces Hemorrhage Formation and Mortality After Administration of Thrombolytics in Experimental Ischemic Stroke. *Circulation*. 2007;116:411-418.
- Suzuki Y., Role of Tissue-Type Plasminogen Activator in Ischemic Stroke. *J Pharmacol Sci* 113, 203-207(2010).

T

- The ESPIRIT Study Group. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischemia of arterial origin (ESPIRIT): randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:1665-73.
- The National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581-1587.
- Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S. Neuronal cell death and tPA. *Nature*. 1996 Nov 14;384(6605):123-4.

V

- Vargas F, Cheng AT, Velutini G, et al. In vitro antioxidant and photo-oxidant properties of dipyridamole. *Int J Toxicol*. 2001;20:363-368.
- Vargas F, Rivas C, Diaz Y, et al. Antioxidant properties of dipyridamole as assessed by chemiluminescence. *Pharmazie*. 2003;58:817-823.

- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin System. *J Clin Invest.* 1991;88:1067-1072.
- Vivien D, Benchenane K, José P., López-Atalaya, Fernández-Monreal M, Touzani O. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci.* 2004;27(3):155-60.

W

- Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation.* 2006 Oct 31;114(18):1923-32.
- Wang S, Lee SR, Guo SZ, Kim WJ, Montaner J, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. *Stroke.* 2006 Jul;37(7):1910-2. Epub 2006 Jun 1.
- Wang X, Asahi M, Lo EH. Tissue type plasminogen activator amplifies hemoglobin-induced neurotoxicity in rat neuronal cultures. *Neurosci Lett.* 1999 Oct 22;274(2):79-82.
- Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW, EH Lo. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003 Oct;9(10):1313-7. Epub 2003 Sep 7.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med.* 1998;4:228-231.
- Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal*, 2005.
- Weyrich AS, Denis MM, Kuhlmann-Eyre JR, Spencer ED, Dixon DA, Marathe GK, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation* 2005;111;633-642

X

- Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke.* 2000 Jul;31(7):1744-51.

Y

- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic

matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Apr;27(4):697-709. Epub 2006 Jul 19.

- Yepes M et al., Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 2003;1533-1540.
- Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Biedermann T, Grisanti S, Lüke M, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Toxic effects of recombinant tissue plasminogen activator on cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr;49(4):1392-7.

Z

- Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and the therapeutic implications. *Neurol Res.* 2004;884-892.