



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de la lesión por reperfusión en la isquemia cerebral experimental y su tratamiento

Angélica María Salas Perdomo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



# ESTUDIO DE LA LESIÓN POR REPERFUSIÓN EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL Y SU TRATAMIENTO

Tesis doctoral presentada por  
**ANGÉLICA MARÍA SALAS PERDOMO**  
Barcelona, Enero de 2019



La interesada:

ANGÉLICA MARÍA SALAS PERDOMO

VºBº del tutor

Dr. ÁNGEL MARÍA CHAMORRO SÁNCHEZ

Profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona  
Jefe de la Unidad Funcional de Patología Vascul ar Cerebral del Hospital Clínic de Barcelona  
Jefe del grupo de Isquemia Cerebral del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i  
Sunyer (IDIBAPS)

VºBº de la directora

Dra. ANNA MARIA PLANAS OBRADORS

Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el  
Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC), y Coordinadora del Área de Neurociencias del IDIBAPS

VºBº del codirector

Dr. FRANCESC MIRÓ MUR

Investigador del Programa PERIS de la Conselleria de Salut de la Generalitat de Catalunya en el  
Hospital Clínic de Barcelona





Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC) y en parte en el Centre de Recerca Biomèdica Cellex de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) dentro de los proyectos nacionales del Ministerio de Economía y Competitividad: SAF2014-56279-R y SAF2017-87459-R, y del Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS: PI15/00430, con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



**A mis abuelos, a mi hermano**

**y a mi padre (q.e.p.d.)**



## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha supuesto un arduo trabajo durante muchos años, durante los cuales se han involucrado un gran número de personas a las que quisiera agradecer:

En primer lugar a mi directora de tesis, Anna Planas, por creer en mí y darme la oportunidad de hacer el doctorado, por ser un modelo a seguir y un referente como mujer científica. Gracias por el apoyo durante todos estos años, por saber resolver todos los contratiempos y por el ejemplo de trabajo duro y constante. También a mi tutor, el doctor Ángel Chamorro por su soporte y sus ideas inspiradoras.

Por su experiencia, sus conocimientos y su gran contribución a los artículos que conforman esta tesis, quisiera agradecer especialmente a Carles Justícia, Francesc Miró y Xabier Urra. También a Fernando, por inculcarme el inmenso respeto que merece el trabajo con animales.

A todos mis compañeros, con los que he trabajado a lo largo de estos años. Hemos compartido infinidad de momentos, de situaciones y de sentimientos. Gracias por la ayuda, la paciencia, las risas y las lágrimas. Sin el apoyo de todos ustedes, mis amigos, habría sido más difícil. A Bego, Vane y Tito que han sido como mi familia en España, siempre disponibles para escucharme, enseñarme y ayudarme en cualquier aspecto.

A mis padres, porque sin ellos nunca habría sido la persona que soy. A mi hermano por ser un gran ejemplo, por creer en mí y ayudarme a lograr mi sueño de estudiar en el extranjero. Te extraño infinitamente. A mi familia, especialmente a mis tíos, por estar siempre para mí, por ejercer de padres, por cuidarme y hacerme sentir parte de una familia inmensamente amorosa. A Jime por ser tan buena editora, por ser la mejor prima del mundo y siempre tener tiempito para mí.

A Carlos mi gran compañero de viaje, porque sé amor que hacer parte de este proyecto ha sido difícil, pero ya está finalizando. Gracias por la paciencia, el apoyo y las ideas. Gracias por compartir esta vida conmigo y por nuestro cachorrito Alejandro, el inicio de nuestro nuevo proyecto de vida.

¡Solo me queda decir gracias, gracias y más gracias a todas las personas que han hecho parte de este proyecto durante tantos años, todos y cada uno de ustedes han dejado huella en mí!

## *ÍNDICE*





ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
1. ICTUS .....	11
1.1 Clasificación.....	11
1.2 Epidemiología.....	12
1.3 Intervenciones terapéuticas del ictus isquémico.....	13
1.2.1 Trombólisis.....	14
1.2.2 Trombectomía mecánica.....	14
1.4 Modelos animales de isquemia cerebral .....	15
2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS .....	18
2.1 Sistemas anatómicos.....	18
2.1.1 Unidad neurovascular .....	18
2.1.2 La barrera hematoencefálica .....	18
2.1.2.1 Complejo de uniones de las células endoteliales.....	21
2.2 Trombosis intravascular .....	23
2.3 Cascada isquémica .....	26
2.3.1 Déficit energético y excitotoxicidad.....	26
2.3.2 Acidosis tisular y estrés oxidativo .....	27
2.3.3 Despolarizaciones del peri-infarto .....	27
2.3.4 Inflamación.....	27
2.3.5 Apoptosis.....	29
2.4 Efectos de la hiperglucemia en el ictus isquémico.....	29
3. EFECTOS DE LA REPERFUSIÓN.....	31
3.1 Estrés oxidativo .....	32
3.2 Infiltración leucocitaria .....	34
3.2.1 Moléculas de adhesión.....	35
3.2.2 Leucocitos infiltrantes .....	38
3.2.2.1 Los linfocitos.....	39
3.2.2.2 Las plaquetas y su interacción con los leucocitos .....	43
3.3 Ruptura de la BHE .....	45
3.3.1 Metaloproteinasas de matriz (MMPs) .....	47
3.4 Transformación hemorrágica del infarto .....	49
4. NEUROPROTECCIÓN.....	52
4.1 Antioxidantes .....	53
4.1.1 Ácido úrico.....	54

## ÍNDICE

---

4.2 Inmunomoduladores.....	56
4.2.1 Fingolimod.....	57
OBJETIVOS.....	61
ARTÍCULOS.....	65
ARTÍCULO N°1.....	67
ARTÍCULO N°2.....	81
ARTÍCULO N°3.....	93
DISCUSIÓN.....	114
Discusión Global.....	124
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131
ANEXOS.....	159
ANEXO A.....	161

## *ABREVIATURAS*



## ABREVIATURAS

---

<b>AJ</b>	Uniones adherentes
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AU</b>	Ácido úrico
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>CAMs</b>	Moléculas de adhesión
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCL2</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CT</b>	Tomografía computarizada
<b>ECAs</b>	Ensayo controlado aleatorizado
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>FSC</b>	Flujo sanguíneo cerebral
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HI</b>	Infarto hemorrágico
<b>HIF-1</b>	Factor inducible por la hipoxia
<b>HP</b>	Hemorragia parenquimal
<b>I/R</b>	Isquemia/Reperfusión
<b>ICAM1 e ICAM2</b>	Molécula de adhesión intercelular 1 y 2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>IgSF</b>	Superfamilia de Ig
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$
<b>IL8</b>	Interleuquina 8
<b>IRF1</b>	Factor regulatorio de interferón 1
<b>LRP</b>	Receptor de la lipoproteína de células endoteliales
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B4
<b>MAC1</b>	Antígeno 1 del macrófago
<b>MCH</b>	Complejo de histocompatibilidad
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de la matriz extracelular
<b>MPIO</b>	Partículas micrométricas de óxido de hierro
<b>MRI</b>	Imágenes de resonancia Magnética
<b>mRs</b>	Escala modificada de Rankin
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B

## ABREVIATURAS

---

<b>NLR</b>	Ratio de neutrófilos/linfocitos
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintetasa
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ONOOH</b>	Ácido peroxinitroso
<b>PECAM1</b>	Molécula de adhesión plaqueta-endotelio
<b>PSGL1</b>	Ligando P-selectina glicoproteína 1
<b>Rag</b>	Gen de activación de la recombinasa
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno (RNS)
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (ROS)
<b>rtPA</b>	Activador tisular del plasminógeno recombinante
<b>SAI</b>	Infecciones asociadas al ictus
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>S1P</b>	Esfingosina-1-fosfato
<b>STAT3</b>	Factor activador de la transcripción
<b>Tc</b>	Células T citotóxicas
<b>TCR</b>	Receptor de la célula T
<b>TF</b>	Factor tisular
<b>TH</b>	Transformación hemorrágica
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TIMP</b>	Inhibidor de MMPs del tejido
<b>TJ</b>	Uniones estrechas
<b>tMCAO</b>	Oclusión transitoria de la arteria cerebral media
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>tPA</b>	Activador tisular del plasminógeno
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A2
<b>UNV</b>	Unidad neurovascular
<b>u-PA</b>	Uroquinasa
<b>VCAM1</b>	Molécula de adhesión vascular-celular 1
<b>VE-cadherin</b>	Cadherina endotelial vascular
<b>vWF</b>	Factor de von Willebrand
<b>ZO-1</b>	Zona ocludens

## *INTRODUCCIÓN*





## 1. ICTUS

El término ictus procede del latín y significa golpe o ataque. El ictus es una enfermedad cerebral de origen vascular que se presenta de modo súbito. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como un fenómeno agudo que causa una interrupción permanente o transitoria del aporte sanguíneo al cerebro, con la consiguiente muerte de las células cerebrales por la falta de oxígeno.

El cerebro necesita de un 20% de la circulación sanguínea para cubrir sus necesidades de oxígeno y energía, por esta razón, cuenta con una gran cantidad de vasos sanguíneos y múltiples mecanismos para mantener constante la cantidad de sangre circulante. Cuando los vasos sanguíneos se lesionan, la sangre no llega adecuadamente al cerebro provocando la disminución o anulación de la función de la zona afectada.

Si el riego sanguíneo decae drásticamente a un flujo menor de 10 ml/100 g de tejido por minuto, las células de esa zona del cerebro se necrosan y mueren, ocasionando una lesión irreversible, dicha zona es denominada núcleo isquémico (del inglés *ischemic core*; Fig. 1) (Peisker *et al.*, 2016). Alrededor de esta, hay otra zona que permanece estructuralmente intacta aunque el flujo sanguíneo esté disminuido, esta zona se denomina penumbra, que corresponde a una región en riesgo de sufrir muerte neuronal que puede evitarse si hay reperfusión (Neuhaus *et al.* 2014<sup>a</sup>; Peisker *et al.* 2016).

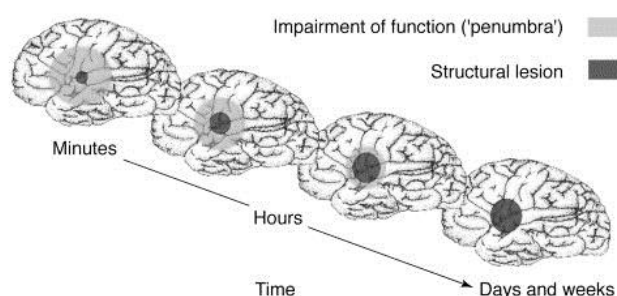


Fig. 1 Esquema del crecimiento de la lesión isquémica con el tiempo. En negro se observa el núcleo isquémico (core) y la zona circundante en gris es la penumbra. Tomado de Dirnagl *et al.* 1999

La penumbra es muy importante, ya que el infarto cerebral con el tiempo va creciendo desde el núcleo afectando las zonas aledañas. Las células de la penumbra, que sufren hipoperfusión, inicialmente aún son viables pero están expuestas a numerosos factores perjudiciales. En el núcleo del infarto las células están sufriendo necrosis y producen diversas reacciones metabólicas y sustancias potencialmente tóxicas que pueden actuar en la penumbra (Ferrer and Planas, 2003), afectando a las neuronas que son muy susceptibles a todos los estímulos. Esta zona de penumbra es el principal objetivo de las intervenciones terapéuticas.

### 1.1 Clasificación

Los ictus generalmente se clasifican según su naturaleza, que puede ser hemorrágica o isquémica.

- La hemorragia cerebral o ictus hemorrágico se da aproximadamente en un 20% de los casos de ictus (Johnson *et al.*, 2016). Principalmente es originado por enfermedades como la hipertensión de vasos pequeños que causa diminutos aneurismas que eventualmente se rompen (Donnan *et al.*, 2008).
- El ictus isquémico o isquemia cerebral se produce cuando se ocluye un vaso. Aproximadamente un 80 a 85% de los ictus son isquémicos (Thrift *et al.*, 2001; Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004; Neuhaus *et al.*, 2014). Los fenotipos etiológicos más importantes suelen ser: fenotipo A: ateromatosis; fenotipo S: afección de vaso pequeño; fenotipo C: fuente cardioembólica; fenotipo O: otras causas (Sobрино García *et al.*, 2013).

La correcta categorización etiológica del ictus es fundamental para seleccionar el tratamiento más adecuado. Se pueden tomar en consideración distintas variables como la etiología, la localización, el perfil evolutivo o el mecanismo de producción. (Fig. 2)

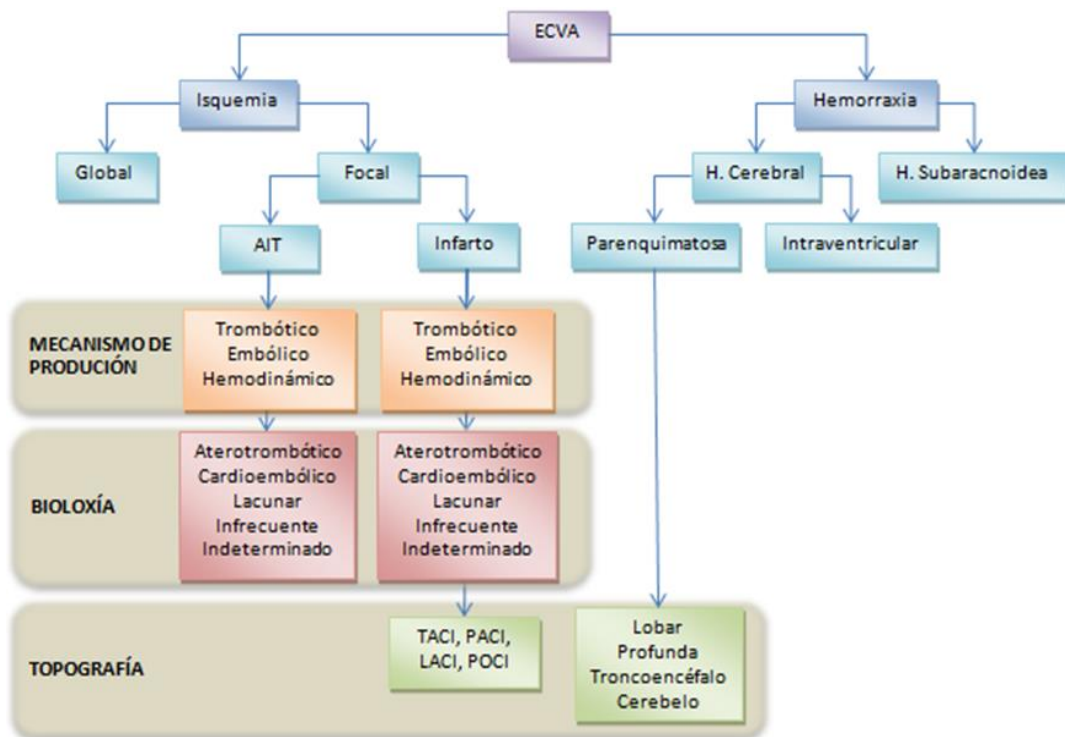


Fig. 2. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular aguda (ECVA) según su naturaleza. AIT: ataque isquémico transitorio; ECVA: enfermedad cerebrovascular aguda; TACI: infarto completo de la circulación anterior; PACI: infarto parcial de la circulación anterior; LACI: infarto lacunar; POCI: infarto de la circulación posterior. Esquema modificado de Martínez-Vila *et al.*, 2011

## 1.2 Epidemiología

El ictus causa el 9% de las muertes en el mundo (Donnan *et al.*, 2008). Mundialmente es la segunda causa de muerte y la tercera causa de discapacidad (World Health Organization, 2012;

Feigin *et al.*, 2014). Cada año 15 millones de personas sufren un ictus, de estas, 5 millones mueren y otros 5 millones quedan permanentemente discapacitados (Mackay and Mensah, 2004). En Estados Unidos cada 40 segundos se produce un ictus (Go *et al.*, 2014) y cada 40 minutos se produce una muerte a causa de un ictus (Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010). En España cada 7 minutos alguien sufre un ictus y el 75% de estos acontecen en la población mayor de 65 años (Martínez-Vila *et al.*, 2011).

Los principales factores de riesgo que pueden conducir a un ictus se clasifican en no modificables como: historia familiar de enfermedad cerebrovascular, sexo masculino, mayores de 65 años, y modificables como: hipertensión, tabaquismo, diabetes, hipercolesterolemia, poca actividad física, dieta inadecuada, entre otros. La mayoría de estos factores se relacionan con el estilo de vida y se pueden prevenir. En los países industrializados la incidencia de ictus ha disminuido un 42% durante las últimas 4 décadas (Johnson *et al.*, 2016) gracias a las campañas de prevención de estos factores.

La hipertensión y la diabetes afectan los mecanismos vasculares reguladores de la presión sanguínea. La diabetes particularmente aumenta la susceptibilidad de las células cerebrales al daño isquémico (Moskowitz *et al.* 2010; Peisker *et al.* 2016), se estima que esta aumenta el riesgo de ictus de 2-3 veces en los hombres y de 2-5 veces en las mujeres (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). La hiperglucemia es bastante común en los pacientes con ictus agudo, alrededor del 40% de los pacientes con ictus la presentan, incluyendo aquellos sin antecedentes de diabetes (Castilla-Guerra, Fernández-Moreno and Hewitt, 2016). Numerosos estudios indican que una concentración elevada de glucosa en sangre en los pacientes de ictus no diabéticos está asociada a un aumento de la mortalidad y a un peor pronóstico funcional (Amaro *et al.* 2015; Capes *et al.* 2001; Staszewski *et al.* 2009; Castilla-Guerra *et al.* 2016). Igualmente la hiperglucemia está asociada a complicaciones hemorrágicas del infarto después del tratamiento trombolítico (Cucchiara *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 2002) y a un mayor volumen del tamaño del infarto (Els *et al.*, 2002; Baird *et al.*, 2003; Ribo *et al.*, 2007).

Alrededor de la cuarta parte de los pacientes con ictus muere durante el primer mes, una tercera parte hacia los 6 meses y la mitad al año del episodio (Donnan *et al.*, 2008). La morbilidad y la discapacidad causadas por el ictus son las consecuencias más preocupantes, aunque la mortalidad ha disminuido en un 37% en las últimas décadas (Peisker *et al.*, 2016) y en consecuencia la proporción de sobrevivientes con incapacidad ha aumentado. Se estima que de cada 100 000 personas, alrededor de 500 viven con las consecuencias de un ictus (Donnan *et al.*, 2008), implicando un enorme impacto para el sistema socioeconómico y sanitario.

Actualmente, el ictus consume entre un 3-4% del gasto sanitario total en los países desarrollados. Se estima que en 2030 la prevalencia aumentará en un 20,5% (Go *et al.*, 2014) y será la cuarta causa de discapacidad en los países desarrollados (Lopez *et al.*, 2006), con el correspondiente sobrecoste socioeconómico.

### **1.3 Intervenciones terapéuticas del ictus isquémico**

Durante los últimos 20 años se han hecho avances extraordinarios en el manejo de la isquemia aguda. Uno de los más importante sin duda, es la implementación de las unidades de ictus. Gracias a estas se ha disminuido la mortalidad en un 20% (Donnan *et al.*, 2008) y se ha mejorado la recuperación funcional (Dirnagl, 2012). Las unidades de ictus podrían prevenir la muerte o la discapacidad en unos 50 pacientes de cada 1000, mientras que los tratamientos

farmacológicos más clásicos funcionan entre 4 y 6 de cada 1000 casos (Donnan *et al.*, 2008). En el ictus el tiempo es una de las variantes más importantes. Las unidades de ictus ofrecen la posibilidad de empezar las terapias de reperusión a la mayor brevedad. Las terapias usadas actualmente para la isquemia cerebral incluyen la trombólisis intravenosa e intraarterial y la trombectomía mecánica. Se puede usar tratamiento trombolítico y trombectomía en pacientes con oclusión de las arterias proximales (Chamorro *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Trombólisis

La trombólisis por medio del activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA) es el único tratamiento farmacológico aprobado en Estados Unidos y Europa. El rtPA es el tratamiento farmacológico más efectivo hasta el momento, su principal inconveniente es que la ventana terapéutica es muy corta y se limita a las primeras 4,5 horas desde el comienzo de los síntomas (Peisker *et al.* 2016; Urra & Chamorro 2013). Hay muchas contraindicaciones para el tratamiento con rtPA, entre ellas: pacientes que presentan convulsiones, cirugías recientes, problemas de coagulación y sobre todo los pacientes con un recuento plaquetario menor a 100,000 plaquetas por microlitro ( $\mu\text{l}$ ) que no pueden recibir ningún tratamiento trombolítico.

El mayor efecto adverso de la trombólisis es la transformación hemorrágica (TH) del infarto que se observa entre el 6 y 7% de los casos (Donnan *et al.* 2008; Urra & Chamorro 2013; Lakhan, Kirchgessner & Hofer 2009). El riesgo de TH aumenta por hipertensión, hiperglucemia, déficit neurológico grave y en pacientes de edad avanzada. Se ha demostrado que el tPA aumenta los niveles de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) en la isquemia cerebral, produciendo la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) con el consiguiente riesgo de TH (Michalski *et al.*, 2012). Por otra parte, la TH promueve la muerte neuronal y la activación de la microglía aumentando el daño isquémico (Gasche *et al.*, 2006).

Globalmente la mayoría de centros usan rtPA solo en un 5% de todos los pacientes con ictus (Donnan *et al.* 2008; Papadopoulos *et al.* 2016). Habitualmente la trombólisis se aplica de forma intravenosa, no obstante, en algunos centros es posible administrar la trombólisis de forma intraarterial que puede ser más efectiva al aplicar rtPA directamente en la arteria ocluida.

Visto que el tratamiento trombolítico no es siempre suficiente para lograr la recanalización vascular se han desarrollado nuevas estrategias. La sonotrombólisis, que consiste en la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia por medio de una sonda transcraneal en el segmento del vaso ocluido, ha demostrado mejorar la actividad del rtPA (Papadopoulos *et al.* 2016; Peisker *et al.* 2016b). Diversos estudios han demostrado que la energía producida por el ultrasonido acelera la trombólisis al producir movimiento del fluido alrededor del coágulo, al aumentar el área de contacto, y al causar un debilitamiento mecánico del coágulo potenciando el efecto enzimático del tPA (Donnan *et al.* 2008; Papadopoulos *et al.* 2016; Polak 2004; Sakharov *et al.* 2000), pero puede incrementar el riesgo de TH.

### 1.2.2 Trombectomía mecánica

Durante los últimos 15 años se han testado diversas técnicas endovasculares para la resolución de la isquemia cerebral. Los dispositivos de trombectomía, son aparatos mecánicos que se desarrollaron para extraer el coágulo directamente de la arteria ocluida (Fig. 3). La trombectomía mecánica con estos dispositivos puede ser aplicada de forma más extensa y dentro de una ventana terapéutica más larga (6 horas, o más según los centros) (Peisker *et al.*,

2016). Este procedimiento debe ser llevado a cabo en conjunto con técnicas de imagen avanzadas como la angiografía por tomografía computarizada (CT), primero, para obtener información de la posición de la oclusión; segundo, para observar el curso del catéter y por último para ver los resultados obtenidos.

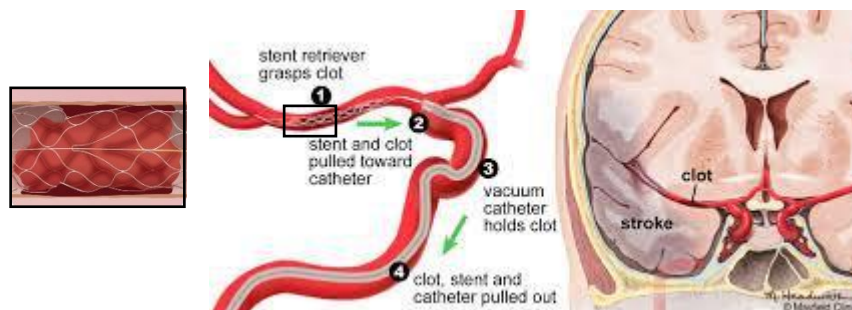


Fig. 3. Representación gráfica de cómo funciona un "stent retriever" (dispositivo para la trombectomía) en el ictus isquémico. Esquema modificado: <http://strokesupport.in/mechanical-thrombectomy-new-treatment-for-severe-cases-of-stroke/> y <http://lifemedmedical.com/>

Aunque el índice de revascularización ronda el 80% (Khandelwal, Yavagal and Sacco, 2016; Peisker *et al.*, 2016) y la recuperación funcional es muy favorable entre 0 a 2 en la escala modificada de Rankin (mRs) (Chamorro *et al.*, 2016), la tasa de TH es similar a la de trombólisis (Urra and Chamorro, 2013).

En el 2015 se han publicado los resultados de 5 grandes ensayos estableciendo de manera inequívoca que la trombectomía mecánica es el nuevo estándar de tratamiento para los pacientes con ictus isquémico agudo y oclusión de la circulación anterior proximal (Berkhemer *et al.*, 2015; Jovin *et al.*, 2015; Urra *et al.*, 2015; Coutinho *et al.*, 2016; Goyal *et al.*, 2016). No obstante, actualmente cada hospital tiene diferentes criterios de inclusión según sus protocolos y experiencia.

#### 1.4 Modelos animales de isquemia cerebral

La investigación en modelos animales es imprescindible para el estudio de la fisiopatología de la isquemia cerebral, de las posibles dianas terapéuticas y del desarrollo de agentes farmacológicos.

La mayoría de los estudios experimentales se centran en la neuroprotección y la modulación de la respuesta inflamatoria de la isquemia cerebral. Muchos de estos agentes han demostrado efectividad en los modelos experimentales, pero en el momento de hacer la traslación a la clínica, estos agentes han fallado. De aproximadamente 1026 fármacos que se habían probado en modelos animales hasta el 2009, 114 fueron sometidos a ensayos clínicos sin mostrar eficacia (Lakhan, Kirchgessner and Hofer, 2009). Está claro que los modelos animales presentan un gran número de limitaciones y que ningún modelo animal imita por completo las circunstancias de la patología en humanos. Por ejemplo, los estudios suelen llevarse a cabo en animales sanos y jóvenes en los que solo se reproducen algunos aspectos de la patología humana (Neuhaus *et al.*, 2014), a diferencia de los pacientes que suelen ser personas de edad avanzada con otras enfermedades concomitantes además de los factores de riesgo como diabetes o tabaquismo. En la Tabla 1 podemos observar las principales diferencias

que hay entre el ictus clínico y el experimental y algunas sugerencias para aumentar la calidad de la investigación preclínica en el ictus isquémico.

Tabla 1. Comparación del ictus clínico y experimental, con modificaciones sugeridas para aumentar la relevancia clínica de los modelos animales. Tomada de (Neuhaus *et al.*, 2014)

Clinical Stroke	Preclinical Stroke	Potential Improvements	Caveats of Improving the Models
Typically >65 y	Typically young animals	Use of aged animals	Increased cost, time, mortality
Often extensively comorbid: hypertension, diabetes, hepatic disease, renal disease, cardiovascular disease	Typically healthy at time of stroke inducement	Use of comorbid animals: hypertensive rat strains, chemically induced diabetes	Increased cost, time, mortality; comorbidity models not necessarily accurate representations of clinical disorders
Great variation in site, duration, and extent of ischemia	Highly consistent areas of ischemia, targeting MCA in vast majority of experiments	Use of thromboembolic models, stroke-prone strains or transgenics (particularly in conjunction with comorbidities)	Current models are extremely well documented and widely used throughout the field, making conclusions more generalizable; targeting other arteries would be surgically more invasive.
Outcome measured in terms of mortality and functional impairment, on a chronic timescale	Outcome measured primarily in terms of histological or MRI changes (particularly in rodents), on an acute/subacute timescale	More extensive behavioral testing using clinically relevant tasks, longer survival periods following ischemia	Procedural confounders can complicate analysis: presence of neck and head wounds, ligation of arteries supplying cranial muscles, nerve damage
Dose and delivery optimization of putative neuroprotectants is limited; ethical concerns; patient availability	Wide scope for optimization of dose and delivery	Clinically relevant administration methods, based on ADME and toxicity data, need to be established preclinically.	Even if clinically inappropriate, experiments using large doses and pretreatment can provide insight into pathological processes and reveal further, potentially more accessible targets
Pretreatment is impossible (or, at best, very challenging and costly), except in very high-risk patient subsets	Pretreatment is widely used	Drug administration must be limited to clinically relevant time window (ie, $\geq 1$ h from occlusion)	

Por lo tanto, para poder extrapolar los resultados experimentales prometedores a tratamientos clínicos, es importante realizar la investigación experimental siguiendo unos estándares adecuados en los modelos animales, como son las recomendaciones de la “Mesa redonda de la Industria Académica de Terapia del Ictus” (STAIR siglas en inglés) (Fisher *et al.*, 2009) donde recomiendan estandarizar aspectos como la aleatorización, el factor ciego, el cálculo del tamaño de la muestra, los criterios de exclusión, el reporte transparente de los resultados obtenidos, entre otros (Fisher *et al.*, 2009; Howells, Sena and Macleod, 2014). Actualmente los investigadores preclínicos tratamos de llevar a cabo estas recomendaciones, por ejemplo, hemos participado en el primer ensayo preclínico Europeo aleatorizado, controlado y multicéntrico sobre ictus (Llovera, Hofmann, Roth, Salas-Perdomo, Ferrer-Ferrer, Perego, E.R. Zanier, *et al.*, 2015), tal como se puede ver en Anexo A.

Los modelos animales de isquemia cerebral se pueden clasificar basándose en diferentes factores (Tabla 2) como la especie, el mecanismo de oclusión, la etiología del ictus, la presencia o ausencia de reperusión (isquemia transitoria o permanente), el territorio afectado o una combinación de estos factores (Braeuninger and Kleinschnitz, 2009).

Por razones éticas y prácticas los modelos murinos (ratas y ratones, especialmente en estudios transgénicos) son los más usados en la investigación de la isquemia cerebral. Este trabajo se centra en el estudio de la isquemia transitoria por medio del modelo de oclusión de



la arteria cerebral media (MCAO) en ratones. El modelo de MCAO fue desarrollado en ratas en 1975 (Robinson *et al.*, 1975), pero requería de craneotomía siendo muy invasivo. A finales de los 80 se desarrolló el modelo de oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (Longa *et al.*, 1989).

Tabla 2. Resumen y clasificación de los modelos experimentales de ictus isquémico.  
Tomada de (Braeuninger and Kleinschnitz, 2009)

<b>Cerebral Ischemia</b>	<b>Etiology</b>	<b>Reperfusion (transient ischemia) or permanent ischemia</b>	<b>Examples</b>
Global model of circulatory arrest or severe hypotension	Intravascular	Transient or permanent	Cardiac arrest with or without cardiopulmonary resuscitation
	Extravascular	Transient or permanent	Cervical compression by neck cuff; ligation of several brain-supplying arteries
Focal	Intravascular	Transient or permanent	Intraluminal thread middle cerebral artery occlusion model
	Extravascular	Transient or permanent	Surgical middle cerebral artery occlusion models using ligation, clipping, electrocauterization etc.; endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion
Multifocal	Intravascular	Transient (spontaneous lysis or thrombolytic therapy possible in blood clots) or permanent	Embolization models using blood clots, microspheres or other embolus material

El procedimiento quirúrgico de la oclusión intraluminal consiste en introducir un filamento de nailon desde la arteria carótida común hasta el origen de la arteria cerebral media en el polígono de Willis (Fig. 4), una vez allí se mantiene por un tiempo determinado y luego se retira lentamente permitiendo que se restablezca el flujo sanguíneo al cerebro.

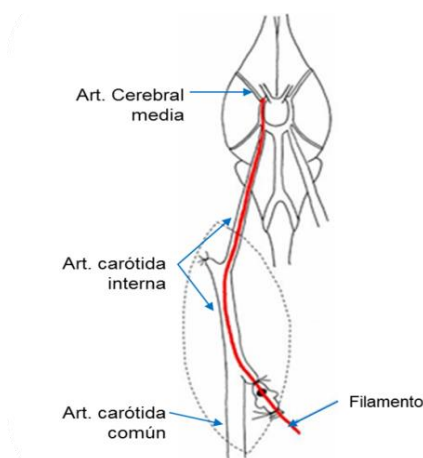


Fig. 4. Esquema del modelo quirúrgico de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en roedores.

Como el ictus es la consecuencia directa de la oclusión de un vaso sanguíneo, es posible que el volumen del infarto se pueda correlacionar con la gravedad y duración de la reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC). Si el FSC es menor del 25% de lo normal, la probabilidad de infarto es superior al 95%, pero si el flujo es mayor del 50% la posibilidad de que haya zonas

infartadas es inferior al 5% (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004). Así mismo, es importante mantener la oclusión durante un tiempo determinado vigilando que no se produzca una reperfusión espontánea. Para poder asegurar que los modelos cumplen estos requisitos, es importante hacer una correcta monitorización de las constantes fisiológicas (temperatura, FSC, etcétera).

## 2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS

### 2.1 Sistemas anatómicos

Durante muchos años la investigación de la isquemia se enfocó en los eventos bioquímicos que ocurrían en la neurona después de la interrupción del flujo sanguíneo, sin embargo, con los avances en la investigación surge la idea de una perspectiva más global del cerebro. Existen extensas evidencias de que se produce una comunicación bidireccional entre la microvasculatura y las neuronas, tanto en condiciones normales como en el ictus (Bastide *et al.*, 2007; del Zoppo, 2010b; Dirnagl, 2012). De allí surge el concepto de unidad neurovascular (UNV).

#### 2.1.1 Unidad neurovascular

Los procesos isquémicos y la reperfusión comprometen la viabilidad de todas las células del cerebro y de la microvasculatura cerebral. Todas las células de la unidad están involucradas en una compleja señalización y ejecución de las cascadas desencadenadas por la falta de suministro energético (Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010).

La UNV está comprendida por la microvasculatura (endotelio, lámina basal, pericitos), los astrocitos, las neuronas con sus axones y las células gliales (Fig. 15). Bajo condiciones normales la UNV controla el FSC local y regional (Bastide *et al.*, 2007; del Zoppo, 2009).

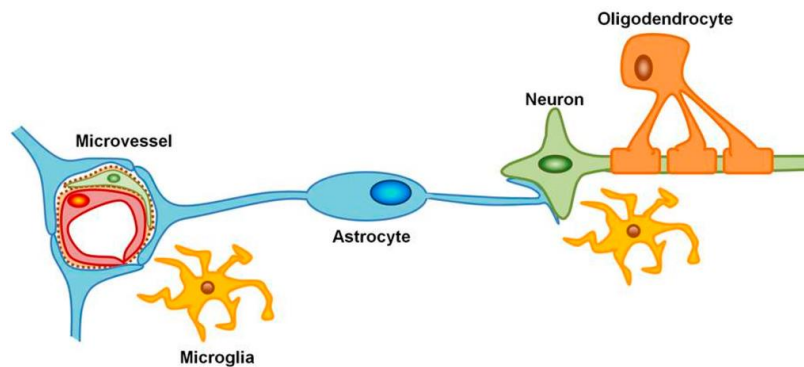


Fig. 5. Diagrama esquemático de la unidad neurovascular (UNV). La interrelación de microvasos, astrocitos, neuronas y células de soporte incluyendo microglía y oligodendrocitos. Tomado de (Abeyasinghe *et al.*, 2016)

#### 2.1.2 La barrera hematoencefálica

Para el correcto funcionamiento neuronal se requiere un ambiente extracelular altamente regulado, por esto se necesita tener una interfaz entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema circulatorio periférico. Este aspecto homeostático de la microcirculación cerebral, en



colaboración con todos los componentes de la UNV, se conoce como la barrera hematoencefálica (BHE).

La BHE es una barrera de difusión que consiste en una red interdependiente de células destinada a separar el SNC de la circulación sistémica (Sandoval and Witt, 2008). Una de sus primeras funciones es la de regular la permeabilidad paracelular, limitando el movimiento de solutos, iones y agua. Regula dinámicamente el balance iónico, la absorción de nutrientes, la extracción de tóxicos y la hemodinámica (Hawkins and Davis, 2005; Sandoval and Witt, 2008). La permeabilidad de la barrera está determinada por las interacciones de la microvasculatura con los astrocitos y por el complejo de uniones interendoteliales. La BHE está en más del 99% de los capilares cerebrales (de Vries *et al.*, 1997). La extraordinaria morfología y la funcionalidad de la microvasculatura cerebral, sugieren que las células endoteliales cerebrales son únicas. En el tejido cerebral la microvasculatura es una parte integral del neuropilo y es indispensable, funcional y morfológicamente, para la conformación de la BHE, en conjunto con los astrocitos y las demás células de la UNV.

Los **astrocitos** son las células más abundantes del SNC. Participan en diversas funciones como la transmisión sináptica, la regulación metabólica y en la homeostasis extracelular y promueven la supervivencia neuronal en procesos patológicos (Saijo *et al.*, 2009; Vangeison and Rempe, 2009). Los procesos en forma de pie de los astrocitos envuelven a los capilares y están integrados a la estructura de la lámina basal parenquimal (Engelhardt and Liebner, 2014). El astrocito puede influenciar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Miller, 1999). La cercana yuxtaposición de las células endoteliales con los procesos de los astrocitos y la gran cantidad de superficie capilar cubierta por estos procesos, indican la estrecha comunicación astro-capilar. Los astrocitos son críticos en el desarrollo y mantenimiento de las características de la BHE (Hawkins and Davis, 2005; Sandoval and Witt, 2008). También se ha demostrado que median en el FSC regional (Peppiatt *et al.*, 2006; Sandoval and Witt, 2008), y que la interacción del astrocito con la célula endotelial es esencial en la regulación del contenido de agua del cerebro y el balance electrolítico en condiciones normales y patológicas. También existe evidencia de que pueden tener funciones inmunológicas, pueden presentar antígenos, tienen propiedades fagocíticas y generan citoquinas y quimioquinas en respuesta a gran variedad de estímulos (del Zoppo, 2009). Los astrocitos están localizados entre las neuronas y los capilares. La lámina basal se encuentra adyacente a la membrana plasmática de los pies de los astrocitos.

La **lámina basal microvascular** es una extensión de la matriz extracelular endotelial (ECM). Está compuesta por proteínas estructurales, como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, elastina y varios proteinglicanos, componentes muy susceptibles a la degradación enzimática. Tiene diversas funciones, es un andamio donde las células endoteliales de la vasculatura y el compartimento glial interactúan.

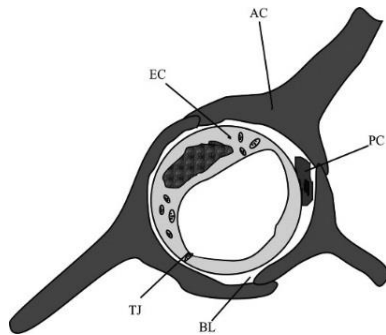


Fig. 6. Representación esquemática en sección transversal de un capilar cerebral. La circunferencia de la luz capilar está completamente rodeada por una sola célula endotelial (EC), cuyas membranas de conexión están conectadas por las uniones estrechas (TJ). Los pericitos (PC) están enlazados a la superficie abluminal de la CE, y estos dos tipos de células están rodeadas por la lámina basal (BL), que es contigua a las membranas plasmáticas de los extremos de los astrocitos (AC). Tomado de (Hawkins and Davis, 2005)

Las células endoteliales y los pericitos están envueltos por la lámina basal que sirve como soporte y anclamiento para las células por medio de sus receptores de adhesión (Hawkins and Davis, 2005; Sandoval and Witt, 2008). La lámina se encarga de la separación intercelular y colabora con su comunicación, también tiene un rol importante atrapando diversos mediadores solubles (por ejemplo el factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares VEGF), estableciendo vías de señalización para la inducción y mantenimiento BHE (Engelhardt and Liebner, 2014). Así mismo, expresa receptores de adhesión que permiten a las células endoteliales, los pericitos y los astrocitos que expresan integrina, adherirse a la laminina de la ECM (Sandoval and Witt, 2008). Además estas interacciones celulares con la ECM pueden estimular gran número de vías de señalización intracelular (Hawkins and Davis, 2005). La integridad de la microvasculatura y sus funciones como barrera dependen de la proximidad del endotelio al pie del astrocito, proximidad mediada por la lámina basal de la matriz (del Zoppo, 2010a), como se puede observar en la figura 6. También es una barrera de tránsito celular al neuropilo (del Zoppo *et al.*, 2000), por lo tanto es un componente esencial de la BHE.

Los **pericitos** son células pluripotenciales y contráctiles que ayudan a mantener la estabilidad de los capilares y la regulación del flujo sanguíneo capilar (de Vries *et al.*, 1997; Peppiatt *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2014). Se conoce que la actividad contráctil del pericito es regulada por la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011). Varios estudios *in vitro* han demostrado que los pericitos pueden contraerse y dilatarse al ser expuestos a neurotransmisores. Así mismo, *in vivo* se ha demostrado que pueden contraerse y recientemente, que también pueden dilatarse (Hall *et al.*, 2014). Sin embargo, no todos los pericitos tienen la misma capacidad para relajarse o contraerse, dependen de los canales iónicos, de los receptores que posean y de los agentes vasoconstrictores (histamina, serotonina, etc.) o vasodilatadores (NO, agonistas colinérgicos) a los que estén expuestos (Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011). Un solo pericito puede estar en contacto con varias células endoteliales. Además, se ha demostrado que los pericitos inducen la polarización de los pies del astrocito (Engelhardt and Liebner, 2014), hecho que los implican en la comunicación neurovascular e intercelular y en la permeabilidad endotelial. También se cree que juegan un papel controlando el crecimiento y remodelación vascular ya que pueden liberar factores angiogénicos (de Vries *et al.*, 1997; Sandoval and Witt, 2008). La interacción de los pericitos con el endotelio es esencial para la formación, crecimiento y mantenimiento de la BHE (Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011; Hall *et al.*, 2014). Adicionalmente, los pericitos producen y secretan numerosos agentes inmunomoduladores que pueden influenciar la respuesta inmune en el SNC (Fabry *et al.*, 1993; Miller, 1999). Pueden limitar el paso de moléculas a través de la barrera por medio de su actividad fagocítica (de Vries *et al.*, 1997) y pueden actuar como presentadores de antígeno (Angelov *et al.*, 1998; Miller, 1999). Los pericitos se encuentran adheridos a intervalos irregulares a la membrana abluminal de las células endoteliales.

Los capilares cerebrales están conformados por una capa de una **célula endotelial** que recubre y forma el lumen del capilar. Estas células endoteliales del SNC se diferencian de las de la periferia porque tienen mayor cantidad de contenido mitocondrial, menor actividad pinocítica, no tienen fenestraciones y sus membranas de fijación están conectadas por sistemas de complejos de uniones (Hawkins and Davis, 2005). Los complejos de uniones (uniones estrechas y adherentes) son indispensables y permiten que la célula endotelial contribuya a mantener la permeabilidad de la BHE. Las células endoteliales también proveen una barrera metabólica gracias al gran número de enzimas que pueden expresar.

### 2.1.2.1 Complejo de uniones de las células endoteliales

El transporte de moléculas a través de la BHE puede ocurrir a través de las células (transcelular) o entre células adyacentes (paracelular). La vía transcelular implica diversos mecanismos, como la difusión pasiva de compuestos lipófilos o desplazamiento mediado por receptores; la vía paracelular permite que los iones y solutos se difundan por su gradiente de concentración entre células adyacentes (Petty and Lo, 2002). Este espacio interendotelial de los capilares cerebrales está caracterizado por la presencia de un complejo de uniones, que son las uniones estrechas (TJ) y las uniones adherentes (AJ). Las TJ en conjunto con las AJ forman un sello con forma de cremallera entre las células endoteliales adyacentes. Esta “cremallera” proporciona separación de las membranas celulares apicales y basolaterales, permitiendo la distribución asimétrica de los constituyentes de la membrana, y forma una especie de cerca que limita la permeabilidad paracelular (Hawkins and Davis, 2005). Las dos tienen como finalidad controlar el paso paracelular a través del endotelio, lo que hace que sean un componente indispensable de la BHE (Fig. 7).

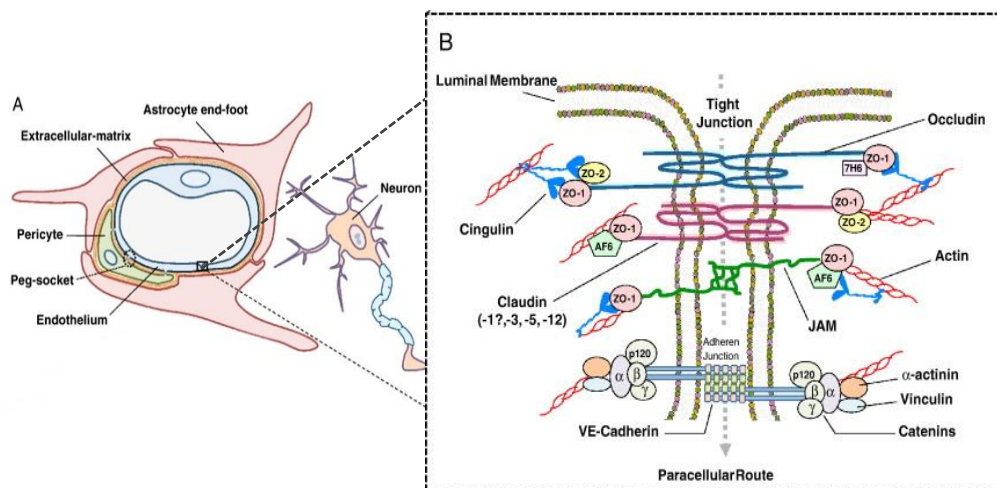


Fig. 7. UNV de la BHE. (A) Representación en sección transversal de la UNV. La circunferencia del lumen capilar está rodeada por células endoteliales, que se conectan a través de uniones estrechas (TJs). Las células endoteliales y los pericitos están envueltos por una membrana basal. Los extremos del astrocito rodean a las células endoteliales y los pericitos, con la señalización neuronal también mediando la función capilar. (B) Esquema de las TJ y las AJ interendoteliales. Esquema modificado de (Sandoval and Witt, 2008)

Las TJ son las estructuras más apicales dentro de la grieta intercelular. Las TJ se componen de una red de ramificación de hilos, donde cada hilo actúa independientemente de los otros. Cada hilo se forma a partir de una hebra de proteínas de transmembrana embebidas en ambas

membranas plasmáticas, con dominios extracelulares uniéndose entre sí. Los principales tipos de proteínas transmembrana son las claudinas y las ocludinas. Estas se asocian con diferentes proteínas de membrana como la zona ocludens (ZO-1) localizadas en el lado intracelular de la membrana plasmática, que anclan las hebras a la actina del citoesqueleto. Así, limitan el flujo paracelular de las moléculas hidrofílicas a través del endotelio. Bajo circunstancias fisiológicas las sustancias con un peso mayor de 180 Da no pueden acceder por las TJ (Sandoval and Witt, 2008).

Las TJ son entidades funcionales y dinámicas reguladas por una variedad de mecanismos de señalización para satisfacer las necesidades y respuestas cambiantes de la BHE (Hawkins and Davis, 2005). Algunas moléculas de las vías de señalización intracelular pueden afectar la permeabilidad paracelular, como las quinasas, la fosfolipasa C, cAMP,  $Ca^{2+}$ , proteínas G, entre otras. Aunque estas moléculas están relacionadas con cambios en la organización de la actina, también lo están con la desestructuración de las TJ (Petty and Lo, 2002). La fosforilación es el mecanismo regulador más importante de las proteínas de las TJ, principalmente la ocludina y la ZO-1 y está relacionada con la permeabilidad de las TJ (Hawkins and Davis, 2005). Tanto el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y la disminución del  $Ca^{2+}$  extracelular pueden causar la ruptura de las TJ de la BHE. Las proteínas G también están involucradas en el mantenimiento de las TJ, estas proteínas son expresadas por las células endoteliales (Fabián *et al.*, 1998), desde donde pueden mediar la migración de linfocitos T al cerebro (Hawkins and Davis, 2005). También pueden alterar la permeabilidad por medio de su interacción con la actina y/o con la ZO-1 (Hawkins and Davis, 2005). Una característica de las TJ endoteliales en el cerebro es su intercalación con los componentes de las AJ a lo largo de toda la longitud de la zona de unión (Petty and Lo, 2002).

Las AJ están presentes en toda la vasculatura, median la adhesión entre las células endoteliales, impiden el contacto durante el crecimiento y la remodelación vascular, inician la polaridad celular y ayudan a la regulación de la permeabilidad paracelular (Hawkins and Davis, 2005; Giannotta, Trani and Dejana, 2013). En el endotelio cerebral las AJ forman un cinturón continuo localizado cerca del final de la zona apical, justo debajo de las TJ y al parecer tienen un rol crucial en la localización, estabilización (Sandoval and Witt, 2008; Harris and Tepass, 2010) y mantenimiento de las TJ (Petty and Lo, 2002).

El principal componente de las AJ son las cadherinas, una familia de glicoproteínas de transmembrana dependientes de  $Ca^{2+}$ . Las cadherinas son capaces de soportar grandes fuerzas (Gulino-Debrac, 2013). Las AJ del endotelio se forman por medio de interacciones homofílicas/homotípicas de las cadherinas vasculares endoteliales (VE-cad) entre las células vecinas. La VE-cad es necesaria para la organización del sistema vascular, controla la permeabilidad vascular e inhibe el crecimiento vascular innecesario (Giannotta, Trani and Dejana, 2013). Aunque el dominio extracelular de la VE-cad produzca la adhesión celular, es insuficiente por sí mismo para la formación de las uniones (Petty and Lo, 2002; Sandoval and Witt, 2008). Para formar las uniones, estas interacciones deben fortalecerse mediante conexiones intracelulares con el citoesqueleto de actina de las células en contacto (Gulino-Debrac, 2013). Así, el dominio citoplasmático de VE-cad se une a las proteínas plasmáticas de anclaje  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina y p120-catenina. Las cateninas  $\beta$  y  $\gamma$  se unen a la  $\alpha$ -catenina que en colaboración con la vinculina y la  $\alpha$ -actinina forma el complejo adhesivo cadherina/catenina que se une a la actina del citoesqueleto (Petty and Lo, 2002; Sandoval and Witt, 2008; Harris and Tepass, 2010; Gulino-Debrac, 2013) (Fig. 8). La VE-cad se ha encontrado en las AJ de las células endoteliales humanas (Dejana, 1997). También se ha encontrado la molécula de adhesión de plaquetas a la célula endotelial (PECAM1), que interactúa con la  $\beta$ -catenina y por

lo tanto participa en la organización de las AJ endoteliales (Petty and Lo, 2002). En adición a los roles de adhesión intercelulares, la VE-cad y los demás componentes de la AJ juegan un papel muy importante en la señalización intracelular (Fig. 8).

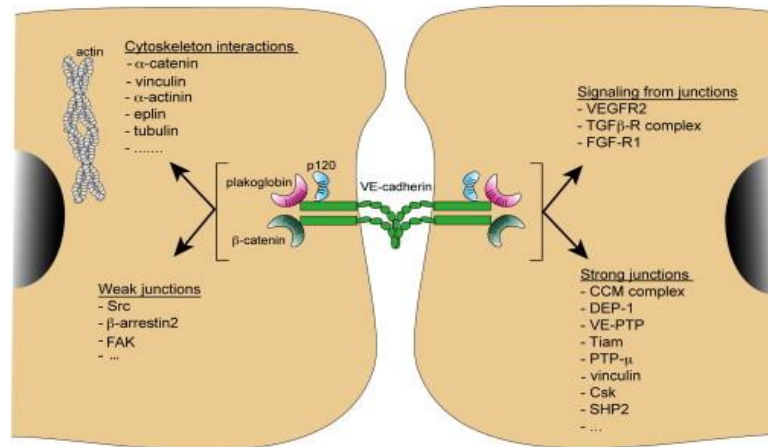


Fig. 8. Múltiples funciones de las AJ en células endoteliales. La organización de las AJ es proporcionada por la unión de la VE-cad con las cateninas. Estas proteínas se unen en diversos complejos con diferentes funciones. Las interacciones de VE-cad con los receptores del factor de crecimiento VEGFR2, FGF-R1 y el complejo TGFβ-R modulan su señalización. La remodelación citoesquelética controlada por VE-cad tiene lugar a través de su interacción indirecta con diversas proteínas de unión a actina (como α-catenina, vinculina, α-actinina). Además, la estabilidad de las uniones adherentes está regulada por el agrupamiento de VE-cad y su asociación indirecta con diferentes socios, tales como Tiam, el complejo CCM y la vinculina. Algunas fosfatasas como VE-PTP, DEP-1, PTP-μ, Csk y SHP2 también podrían asociarse con VE-cad y, directa o indirectamente, disminuir su fosforilación y aumentar la función de la barrera endotelial. Por el contrario, la fosforilación de VE-cad por Src o FAK, así como su interacción con β-arrestina2, induce el debilitamiento de la BHE. Tomado de Giannotta et al. 2013

Las cadherinas y las cateninas pueden formar distintos complejos con varios socios en la misma célula (Giannotta, Trani and Dejana, 2013). Por ejemplo, la VE-cad que está en la membrana celular unida a la β-catenina y la PCAM1 formando un complejo. Estos complejos pueden transferir diferentes tipos de señales a las células, dependiendo de las condiciones funcionales. Además estos complejos pueden ser disociados por diversos estímulos liberando las proteínas (Petty and Lo, 2002; Tran and Zheng, 2017). Hay evidencia de que las cateninas también pueden trasladarse al núcleo para regular la transcripción. Por ejemplo, la β-catenina participa activamente en la vía de señalización de Wnt, cuando las células endoteliales son activadas por Wnt, la β-catenina se libera y puede trasladarse al núcleo y modular factores de transcripción (Petty and Lo, 2002; Giannotta, Trani and Dejana, 2013).

## 2.2 Trombosis intravascular

Tal como se ha comentado anteriormente, del 75 al 80% de las isquemias cerebrales están relacionadas con eventos trombóticos (del Zoppo, 1999). La oclusión cerebrovascular se produce a partir de una trombosis *in situ* o por un tromboembolismo secundario desde otra arteria. Recientemente se ha reconocido que hay una interacción entre las vías trombóticas e inflamatorias del ictus lo que conlleva a desarrollar el concepto de que el ictus isquémico es una patología trombo-inflamatoria (Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011a; De Meyer et al., 2016).



Normalmente si hay un daño en la vasculatura, la ECM queda expuesta a la sangre desencadenando la adhesión y activación de las plaquetas (hemostasis primaria), seguida por la activación de la cascada de la coagulación (hemostasia secundaria)(Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011a). Estas cascadas se sinergizan para formar un trombo rico en fibrina que sella y ayuda a sanar la herida. Sin embargo, cuando esta activación y agregación plaquetaria no está correctamente regulada, se produce la formación de un trombo y probablemente se desarrolle una enfermedad trombótica. La actividad patológica de las plaquetas y la interacción entre sus receptores y ligandos, siempre han estado relacionadas a la fisiopatología del ictus (del Zoppo, 1999; Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011a) no solo durante la oclusión del vaso sanguíneo, sino también durante la reperfusión.

Las fuerzas transversales generadas por la sangre que fluye, que son mayores en la pared vascular, producen una resistencia que se opone a la adhesión y agregación plaquetaria. Sin embargo, la ECM contiene moléculas de adhesión como lamininas, fibronectinas y colágeno. Las plaquetas pueden ligarse a estas macromoléculas con sus respectivos receptores. Entre la multitud de receptores que la plaqueta tiene en su superficie, los dos que se describen a continuación son muy importantes en la agregación y adhesión plaquetaria (Nieswandt and Stoll, 2013).

**A.** La glicoproteína (GP) Ib-V-IX es un complejo receptor que expresan exclusivamente las plaquetas y los megacariocitos (Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008). La subunidad GPIb se puede unir a varios ligandos como: al factor de von Willebrand (vWF), P- selectina, antígeno 1 del macrófago (MAC1), a los factores de coagulación XI, XII y a la trombina (Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008; Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011b). El anclaje inicial de las plaquetas al ECM de la pared del vaso lesionado depende estrictamente de la interacción entre GPIb y vWF. La unión del GPIb-vWF aunque no es muy estable ni duradera, mantiene las plaquetas en contacto con la ECM y es capaz de reducir la velocidad de otras plaquetas (ver Fig. 9, apartado A) (De Meyer *et al.*, 2016). Además, la interacción entre GPIb y la P-selectina expuesta de las células endoteliales contribuye al reclutamiento de más plaquetas (Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008). Estas situaciones permiten que las plaquetas desaceleren e interaccionen con el colágeno y la laminina de la ECM, por medio del receptor GPVI, que también es exclusivo de las plaquetas y sus precursores (Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008; Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011b). La GPVI ejerce una señal de transducción muy fuerte al unirse, lo que produce la activación completa de las plaquetas (De Meyer *et al.*, 2016) y la liberación de los agonistas secundarios de las vesículas plaquetarias (ATP, ADP,  $TxA_2$  y serotonina) que producen trombina (Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011a) (ver Fig. 9, apartado B). La señalización que produce la activación de las plaquetas induce la activación de otros receptores importantes durante la fisiopatología del ictus y la reperfusión.

**B.** La GPIIb/IIIa (o integrin  $\alpha IIb\beta 3$ ) es el receptor de adhesión de integrinas más abundante en la superficie de las plaquetas (De Meyer *et al.*, 2016). Su activación requiere de los agonistas desencadenados por todas estas vías intra y extracelulares que se desencadenaron en el punto anterior. Este es un receptor del fibrinógeno y del vWF (Nieswandt and Stoll, 2013). Este receptor contribuye a la adhesión firme y resistente de la plaqueta a la ECM por medio de la adhesión del fibrinógeno plasmático (Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011a), lo que contribuye al crecimiento del trombo y atrae más plaquetas (Fig. 9, apartado C).

## INTRODUCCIÓN

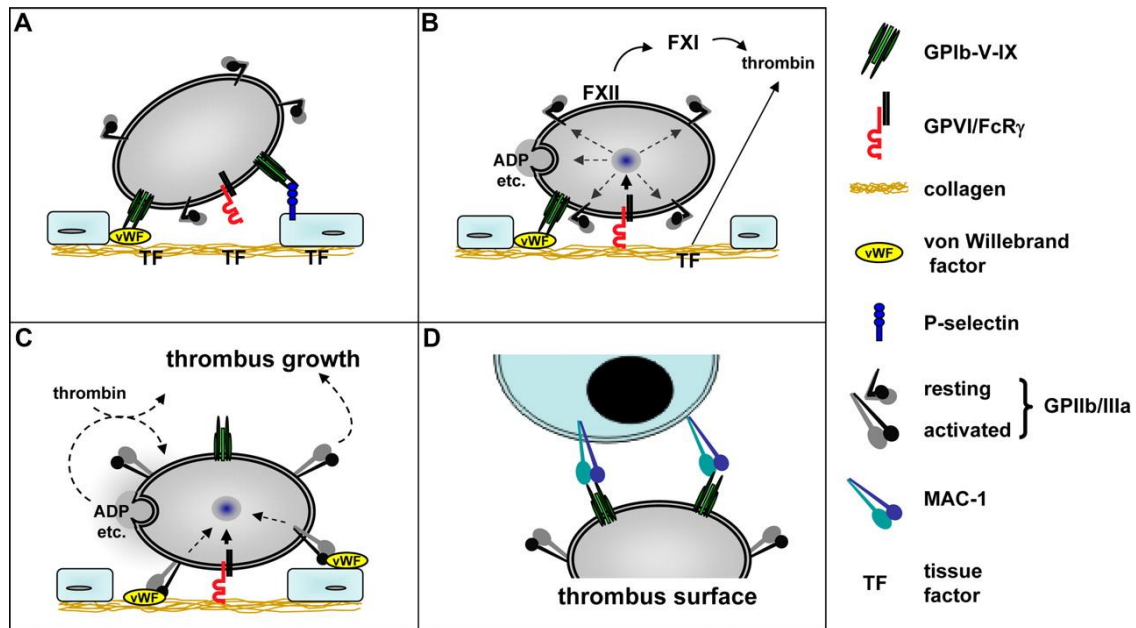


Fig. 9. Modelo de interacción de la plaqueta con la pared del vaso, donde se resume la fisiopatología de la formación del trombo en el ictus isquémico. Tomado de Stoll et al. 2008

Paralelamente la sangre está expuesta al factor tisular (TF) debido al daño endotelial. Lo que se traduce en una mayor formación de trombina por la vía extrínseca de la cascada de coagulación. Igualmente se activa la vía intrínseca de la cascada de la coagulación que se produce cuando la plaqueta libera sus vesículas y el factor XII de la coagulación entra en contacto con cargas negativas activándolo (Afshar-Kharghan and Thiagarajan, 2006; Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008; Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011b) (Fig. 9, apartado B y C). Este proceso causa un aumento en la formación de trombina que permite el crecimiento del trombo. La trombina es el más poderoso desencadenante de la activación y adhesión plaquetaria y de la formación del trombo. El trombo final está alojado en una red de fibrina para resistir las fuerzas generadas por la sangre que fluye.

Las plaquetas activadas pueden reclutar leucocitos que contribuyen al crecimiento del trombo. Vía P-selectina los leucocitos se pueden unir a las plaquetas a través del ligando P-selectina glicoproteína 1 (PSGL1), además, los leucocitos pueden adherirse al fibrinógeno unido a plaquetas en el tapón hemostático (Afshar-Kharghan and Thiagarajan, 2006). Las plaquetas también pueden agregar leucocitos al trombo por medio de la interacción del GPIIb-MAC1 aumentando el tamaño del trombo y contribuyendo a la respuesta inflamatoria observada en el ictus (Fig. 9, apartado D). El vWF promueve la adhesión leucocitaria y es un mediador de inflamación (De Meyer et al., 2016). Adicional a la atracción de leucocitos, los productos que se han liberado de las vesículas plaquetarias al espacio extracelular cuando estas se activan, como el  $\text{TxA}_2$  (Nieswandt et al. 2011b) y otros mediadores inmunes como IL1 pueden contribuir a la inflamación observada en la cascada isquémica, desencadenando una interesante reacción trombo-inflamatoria. Estos eventos que comienzan dentro de la microvasculatura cerebral, se extienden a otros elementos del neuropilo e involucran a las células gliales y neuronas (del Zoppo, 2009).

Los procesos trombo-inflamatorios se pueden presentar durante todas las fases del ictus. Durante el tratamiento trombolítico o la trombectomía estas vías de señalización, activación y

formación del trombo están activas, ocasionando una reperfusión deficiente que aumenta el daño tisular.

### 2.3 Cascada isquémica

Para estudiar el ictus es necesario comprender que el daño cerebral en la isquemia es el resultado de muchos y complejos mecanismos que se producen a través del tiempo y el espacio en el proceso de la maduración del infarto (Fig. 10).

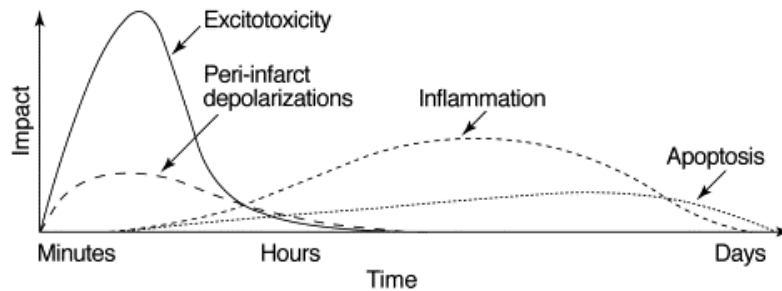


Fig. 10. Esquema de la cascada de los eventos dañinos producidos durante la isquemia cerebral. Tomado de Dirnagl et al. 1999

En el núcleo isquémico la falta de FSC produce, en cuestión de minutos, déficit energético, deterioro de los procesos metabólicos y perturbación de la homeostasis iónica promoviendo la pérdida de la integridad estructural de la célula y causando muerte celular y tisular por necrosis (Mergenthaler et al. 2004; Siesjo 1992). Mientras, en la penumbra, donde las arterias colaterales aportan un flujo residual capaz de mantener la viabilidad de la célula temporalmente, las células de la UNV sufren varios procesos patológicos precedentes a la muerte.

#### 2.3.1 Déficit energético y excitotoxicidad

La reducción del flujo sanguíneo conlleva a un déficit de oxígeno y glucosa, que a nivel celular ocasiona una disminución significativa de ATP. La falta de energía causa el fallo de las bombas que mantienen el gradiente iónico en la membrana, afectando el equilibrio electroquímico y produciendo acidosis (Siesjo 1992). Además se pierde el potencial de membrana, las neuronas y la glía se despolarizan con la resultante activación de los canales de  $Ca^{2+}$  y se liberan gran cantidad de neurotransmisores excitatorios, especialmente glutamato (Mitsios et al. 2006; Dirnagl et al. 1999). Al mismo tiempo la reabsorción presináptica del glutamato está impedida y se acumula en el espacio extracelular. La activación de los receptores inotrópicos del glutamato (NMDA y AMPA) conlleva a la entrada de  $Ca^{2+}$  y  $Na^{+}$  (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010). La entrada excesiva de  $Na^{+}$  y la salida de  $K^{+}$  producen hinchazón de la célula y edema citotóxico (Lo, Dalkara and Moskowitz, 2003; Sandoval and Witt, 2008). La acumulación masiva de  $Ca^{2+}$  activa procesos catabólicos mediados por proteasas, lipasas y nucleasas. El desequilibrio iónico produce la contracción prolongada del pericitio que conlleva una disminución del FS capilar (Hall et al., 2014).



### 2.3.2 Acidosis tisular y estrés oxidativo

Por una parte, la reducción del aporte de oxígeno conduce al incremento del metabolismo anaeróbico celular, que lleva a la acumulación del lactato y por consiguiente a la acidosis tisular (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004). La lactoacidosis contribuye con la hinchazón de las neuronas, los astrocitos y las células endoteliales, a la disminución del diámetro del capilar (Sandoval and Witt, 2008) y por supuesto al aumento de la permeabilidad de la BHE. La acidosis también está relacionada con la producción de radicales libres de oxígeno y puede interferir con la síntesis proteica (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004).

Por otra parte, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular hace que la mitocondria, por medio de la activación de los sistemas de segundos mensajeros asociados a la generación enzimática de radicales libres, produzca especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Chamorro *et al.*, 2016). Estos mecanismos requieren la presencia de oxígeno, por lo que generalmente ocurren durante la reperfusión (capítulo 3). Los radicales libres pueden reaccionar con cualquiera de los componentes celulares (carbohidratos, aminoácidos, fosfolípidos y ADN) y dañarlos (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Lo, Dalkara and Moskowitz, 2003). Así mismo la oxidación de las proteínas, la peroxidación lipídica, la necrosis y/o apoptosis, favorecen la respuesta inflamatoria (Chamorro *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Despolarizaciones del periinfarto

Ante la falta de energía y la liberación de  $\text{K}^+$  y glutamato, las células se despolarizan. En la penumbra, las células se pueden repolarizar con el correspondiente consumo de energía, pero como el glutamato y el  $\text{K}^+$  están incrementados en el espacio extracelular, estas mismas células pueden volver a despolarizarse una y otra vez, generándose ondas de despolarización que se propagan por todo el territorio afectado (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010). La frecuencia y la duración de las despolarizaciones están correlacionadas con la maduración del infarto y el crecimiento del núcleo isquémico (Mies, Iijima and Hossmann, 1993; Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004; Strong and Dardis, 2005).

### 2.3.4 Inflamación

La hipoxia, la activación de los sistemas de segundos mensajeros (fosfolipasa  $\text{A}_2$  y ciclooxigenasa) mediada por el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , el incremento en los radicales libres y las moléculas liberadas por las células dañadas o muertas, desencadenan la síntesis de varios factores de transcripción, tales como el factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), el factor inducible por la hipoxia (HIF-1), el factor regulador de interferón 1 (IRF1) y el factor activador de la transcripción STAT3 (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Lakhan, Kirchgessner and Hofer, 2009). Estos a su vez incrementan la expresión de diversos genes proinflamatorios, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, al igual que MMPs, que propagan las señales inflamatorias y exacerbaban el daño tisular, como se ilustra en la Fig. 11.

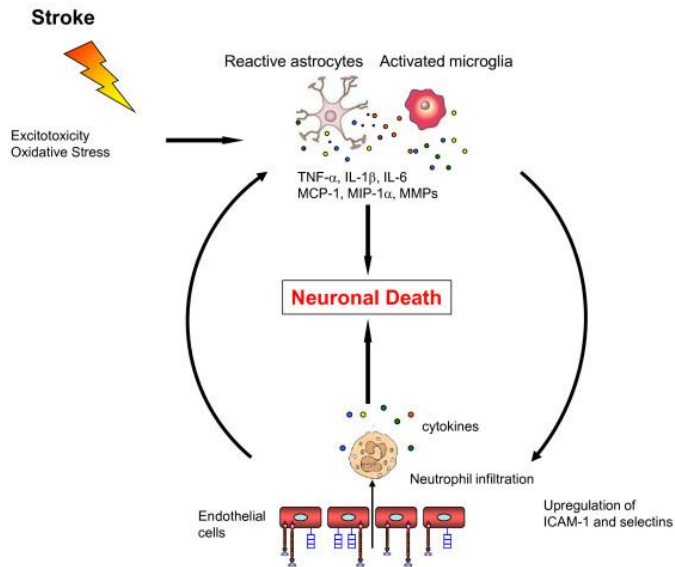


Fig. 11. Diagrama que sintetiza la respuesta inflamatoria postisquémica. Tomado de Lakhan et al. 2009

La pronta producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aumentan la señal inflamatoria. Todas las células de la UNV pueden producir citoquinas (de Vries *et al.*, 1997) y MMPs (Lakhan, Kirchgessner and Hofer, 2009). En las células vasculares y perivasculares, las citoquinas incrementan la expresión de moléculas de adhesión tales como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) y las selectinas P y E (del Zoppo *et al.*, 2000; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010). Las moléculas de adhesión en compañía de las integrinas interactúan con los receptores de superficie de los leucocitos, estos se adhieren al endotelio, cruzan la pared vascular y entran al parénquima cerebral (Fig. 11). La IL-1 $\beta$  ha sido relacionada con el aumento de la permeabilidad de la BHE (de Vries *et al.*, 1997). Además, durante la isquemia disminuye la expresión de la  $\beta$ -integrina que se relaciona con la pérdida de integridad de la ECM y de las TJ con el correspondiente aumento de permeabilidad de la BHE y la formación de edema vasogénico (del Zoppo, 2009). Así mismo la degradación de las proteínas de la ECM ha demostrado tener actividad citolítica.

En la isquemia destacan las quimioquinas de la familia CXC (como la IL-8) atrayente de neutrófilos y la familia CC (como la proteína quimioatrayente de monocitos 1-CCL-2) que recluta principalmente monocitos y macrófagos (Pantoni, Sarti and Inzitari, 1998) al interior del parénquima cerebral. Citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión se encuentran expresadas en el cerebro dentro de las primeras 2 horas tras la isquemia y pueden mantenerse elevadas por varios días después (Mitsios *et al.*, 2006). Las primeras células inmunes en responder al daño isquémico son la microglía y los neutrófilos que exacerbaban el estrés oxidativo y el daño a la BHE (Chamorro *et al.*, 2016).

Por otra parte, tras la isquemia, las neuronas expresan ciclooxygenasa 2 (COX-2), enzima que media la producción de superóxido y prostanoídes tóxicos. Adicionalmente los astrocitos se hipertrofian, mientras que la microglía retrae sus procesos y se activa. La microglía activada tiene el potencial de producir neurotoxinas como radicales libres y prostanoídes (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004), además produce mediadores quimioatrayentes de leucocitos (Pocock and Kettenmann, 2007). Los astrocitos al hipertrofiarse retraen sus procesos, lo que contribuye a la pérdida de la integridad de la BHE y a la formación de edema.

Todos estos procesos que promueven la infiltración de leucocitos a través de la BHE son cruciales en la cascada inflamatoria y en la progresión del infarto. Sin embargo, todas las

células inmunes que están involucradas en el proceso pueden tener roles beneficiosos o dañinos (Chamorro *et al.*, 2016), por ejemplo, algunas poblaciones de células T, como las células T reguladoras (Treg) expresan citoquinas antiinflamatorias que modulan la inflamación (Liesz *et al.*, 2009; Urra *et al.*, 2009). Además, en los estadios más crónicos de la inflamación, los leucocitos promueven eventos críticos y necesarios para la reparación tisular (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010).

### 2.3.5 Apoptosis

Las células del cerebro que están expuestas al exceso de glutamato, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , los radicales libres y el daño mitocondrial y del ADN pueden morir por necrosis o por apoptosis (Vidale *et al.*, 2017). El tipo de muerte celular depende de la naturaleza, la magnitud y el tipo de estímulos y además del tipo de célula (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999). En el núcleo isquémico el mecanismo principal de muerte celular es la necrosis. En la penumbra donde hay un daño menor, ocurre una muerte celular programada, la apoptosis. Esta empieza transcurridas algunas horas del episodio isquémico y puede durar varios días (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004).

La apoptosis está caracterizada por la activación de las caspasas, proteasas que degradan los sistemas funcionales y estructurales de las células (Akpan and Troy, 2013). Las caspasas existen de forma latente en cada una de las células como proteínas precursoras inactivas (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004). Las caspasas 1, 3, 8 y 9 están profundamente relacionadas con la muerte celular en la isquemia cerebral (Ferrer and Planas, 2003). El aumento de  $Ca^{2+}$  y glutamato, los radicales libres y el deterioro del ADN dañan la mitocondria lo que permite la salida del citocromo C al citosol y activa el complejo apoptosoma (Yuan, 2009). El apoptosoma activa la caspasa 9 y permite la activación secuencial en cascada hasta la activación de la caspasa 3, que es la ejecutora de la apoptosis (Mitsios *et al.*, 2006). La caspasa 1 está relacionada con la activación de citoquinas como la IL-1 $\beta$  (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Ferrer and Planas, 2003). Las neuronas parecen ser especialmente susceptibles a la muerte celular mediada por caspasas en los modelos animales (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004; Yuan, 2009; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010; Akpan and Troy, 2013), pero en humanos hay muy poca información sobre la activación de la caspasa 3 (Mitsios *et al.*, 2006) o la apoptosis (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004; Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010) después de un episodio de isquemia cerebral. Aunque sí se ha demostrado que el cerebro humano expresa caspasas 1, 3, 8, 9, receptores de muerte celular y factor activador de proteasas apoptóticas 1 (Apaf-1) capaces de inducir apoptosis (Sandoval and Witt, 2008; Akpan and Troy, 2013).

### 2.4 Efectos de la hiperglucemia en el ictus isquémico.

La hiperglucemia ocurre en el 30-40% de los pacientes con ictus, incluidos los pacientes sin diabetes (Kruyt *et al.*, 2010; Luitse *et al.*, 2012). El aumento de los niveles de glucosa en sangre se asocia a una peor recuperación funcional y mayor mortalidad (Capes *et al.*, 2001), y a un mayor riesgo de TH después del tratamiento con tPA (Bruno *et al.*, 2002; Kruyt *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). La respuesta isquémica a la hiperglucemia varía según el grado de afectación del tejido. En el núcleo isquémico, donde el nivel de flujo sanguíneo está muy reducido, la glucosa sanguínea no tiene mayor efecto puesto que la viabilidad neuronal ya está comprometida en los primeros minutos. Sin embargo, en la región de la penumbra donde las

neuronas son todavía viables y aún hay flujo sanguíneo, la demanda de glucosa es muy elevada y los niveles altos de glucosa pueden afectar la viabilidad neuronal (Kruyt *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014) (Fig. 12).

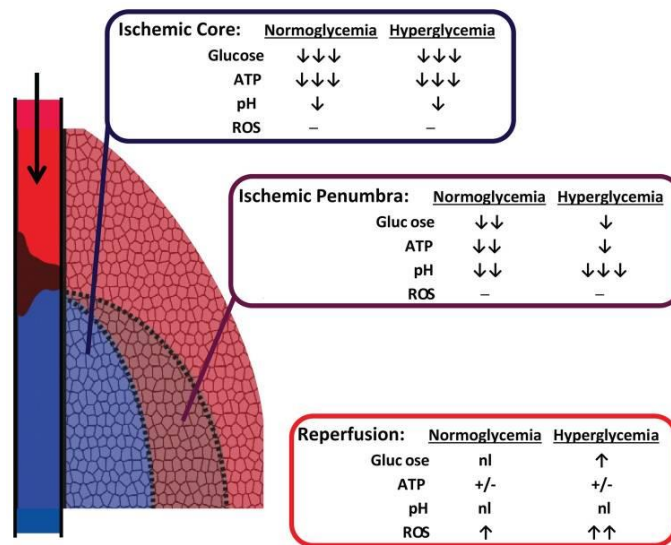


Fig. 12. Diferentes efectos de la hiperglicemia sobre el núcleo isquémico, la penumbra y la reperfusión. La hiperglicemia y la isquemia completa en el núcleo conducen a la reducción de glucosa, oxígeno, agotamiento de ATP y una acidosis leve. Las regiones de penumbra reciben glucosa pero no oxígeno, debido al exceso de glucosa en la sangre se produce glucólisis que puede atenuar el agotamiento de ATP, pero también genera acidosis láctica en proporción a los niveles de glucosa sanguínea. En la reperfusión, el pH se normaliza y el ATP se recupera, pero el aporte de glucosa desencadena un aumento de la producción de ROS. Tomado de (Robbins and Swanson, 2014)

La relación entre la hiperglicemia y el daño cerebral en el ictus isquémico se ha investigado tanto en modelos animales como en la clínica (Bruno *et al.*, 2002; Schaller and Graf, 2004a; Kruyt *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). Una concentración alta de glucosa en sangre puede aumentar el daño celular por diversos mecanismos. Los principales son la acidosis y el estrés oxidativo. Bajo condiciones normales el pH del cerebro es aproximadamente de 7,2. Durante la isquemia el metabolismo anaeróbico de la glucosa y la producción de ácido láctico lo reduce a 6,6 en condiciones normoglicémicas y por debajo de 6 en pacientes con hiperglicemia (Robbins and Swanson, 2014). Reducciones importantes del pH pueden causar desnaturalización de las proteínas y activar los canales iónicos liberando hierro y causando un aumento el daño isquémico cerebral (Ying *et al.*, 2002; Robbins and Swanson, 2014). También hay evidencias de que la hiperglicemia puede aumentar el intercambio de sodio (Yamazaki, Harada and Tokuyama, 2012), la formación anormal de glucoproteínas (Martín *et al.*, 2006), y puede intensificar la respuesta inflamatoria postisquémica (Martín *et al.*, 2006; Tsuruta *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). La hiperglicemia está asociada al aumento de diversos factores de transcripción proinflamatorios como el NF- $\kappa$ B aumentando la producción de citoquinas y quimioquinas (Kruyt *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la hiperglicemia aumenta la adhesión e infiltración de leucocitos en modelos experimentales de isquemia/reperfusión (Panés *et al.*, 1996). Además la hiperglicemia puede aumentar los niveles de cortisol en el cerebro causando un potenciamiento de la muerte neuronal (Martín *et al.*, 2006; Robbins and Swanson, 2014). Todos estos procesos derivados de niveles altos de glucosa en la sangre pueden contribuir a aumentar el daño tisular en la isquemia.

Uno de los efectos más importantes de la hiperglucemia en el ictus isquémico es la producción de ROS, principalmente anión superóxido ( $O_2^-$ ) y óxido nítrico (NO) aumentando el daño causado por el estrés oxidativo (Tsuruta *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). Varios trabajos postulan que el deterioro neurológico debido a la hiperglucemia está asociado a la producción de estos radicales libres, los cuales aumentan con la presencia de oxígeno. Por tanto se piensa que el efecto de la hiperglucemia es más importante durante la reperfusión donde incrementa el daño por reperfusión (Ying *et al.*, 2002; Kruyt *et al.*, 2010; Tsuruta *et al.*, 2010; Luitse *et al.*, 2012) del que se hablará en el capítulo 3.

La hiperglucemia se ha relacionado con el fenómeno de “no reflujo” (ver capítulo 3), que se produce cuando el FSC no vuelve a los niveles basales después de la reperfusión. Esto se debe en parte a que la hiperglucemia estimula las vías de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa en el músculo liso vascular, que promueve la formación de prostaglandinas como el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) que tienen un efecto vasoconstrictor (Schaller and Graf, 2004a), además de aumentar la producción de eicosanoides, con un efecto inhibitorio de la vasodilatación (Kruyt *et al.*, 2010). Por otra parte, la hiperglucemia incrementa la producción de complejos de trombina-antitrombina, estimula la vía del factor tisular (TF) y disminuye la actividad fibrinolítica (Kruyt *et al.*, 2010), promoviendo la trombosis y reduciendo la cantidad de FSC que llega a los capilares después de la reperfusión.

### 3. EFECTOS DE LA REPERFUSIÓN

El único tratamiento aprobado y el más efectivo para la isquemia es la reperfusión del cerebro con sus diferentes modalidades (Maier *et al.*, 2006). La reperfusión es el restablecimiento del FSC al tejido isquémico o hipoperfundido, esta es imprescindible para la recuperación y para evitar la muerte de las células hipoperfundidas del cerebro y las de la microvasculatura. Sin reperfusión el tejido carece del aporte de nutrientes esenciales para la viabilidad celular. Sin embargo diversos estudios demuestran que la reperfusión del cerebro puede tener consecuencias nocivas que se conocen como daño por reperfusión (Carden and Granger, 2000; Eltzschig and Collard, 2004; Nour, Scalzo and Liebeskind, 2013; Granger and Kvietys, 2015). Estudios *in vitro* han demostrado las alteraciones microvasculares provocadas por isquemia/reperfusión (I/R), que incluyen producción aumentada de ROS, aumento de expresión de moléculas de adhesión, disminución de la función de la BHE, transformación hemorrágica del infarto y desarrollo de un fenotipo procoagulante/protrombótico de la pared vascular (Pérez-Asensio *et al.*, 2010; Granger and Kvietys, 2015).

Durante y después de la reperfusión se presentan variaciones del FSC. Preliminarmente se observa una fase inicial de hiperemia que es seguida por un periodo de hipoperfusión (Sandoval and Witt, 2008; Kunitatsu *et al.*, 2009; Onetti *et al.*, 2015). Estas variaciones en el FSC se suelen asociar con picos de aumento de permeabilidad de la BHE (Kuroiwa *et al.*, 1985; Spengos, Tsvigoulis and Zakopoulos, 2006; Witt *et al.*, 2008), como se aprecia en la Fig. 13.

En la fase de hiperemia reactiva se produce una pérdida de la autorregulación del FSC que coincide con la apertura aguda de las TJ de la BHE y la formación de edema intersticial (Schaller and Graf, 2004b; Sandoval and Witt, 2008). Después de la hiperemia ocurre una fase de hipoperfusión que se relaciona con el fenómeno de “no reflujo”. Este fenómeno se describe como el fallo de la microcirculación para mantener el FSC dentro de los niveles basales a pesar

de que haya una apertura satisfactoria de la arteria ocluida, resultando en una deficiencia del soporte nutricional necesario para la recuperación del tejido.

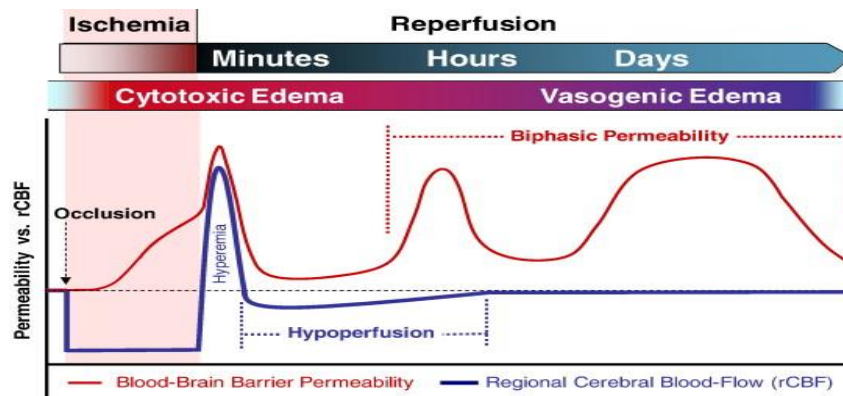


Fig. 13. Esquema de las fases de permeabilidad de la BHE asociadas con la reperfusión después del insulto isquémico. La variabilidad ocurre dependiendo de la distancia entre los tejidos del núcleo isquémico y la duración del insulto isquémico. Esquema modificado de Sandoval & Witt 2008

La hipoperfusión ha sido atribuida a múltiples factores como: depresión metabólica continúa del tejido, edema, hinchazón de las células endoteliales y los pies del astrocito, obstrucciones microvasculares causadas por acúmulos de fibrina, microtrombos y/o adhesión de leucocitos al endotelio, formación del microvello endotelial (Dietrich, Busto and Ginsberg, 1984; del Zoppo and Mabuchi, 2003) y la constricción sostenida del capilar (Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011). Durante la cascada isquémica la producción de  $\text{TxA}_2$  puede inducir vasoconstricción (Schaller and Graf, 2004b). Así mismo, el estrés oxidativo puede inducir la contracción de los pericitos que controlan el flujo sanguíneo cerebral y contribuir al fenómeno del “no reflujo” (Yemisci *et al.*, 2009). Un estudio actual ha demostrado que durante la isquemia los pericitos de los capilares pueden morir y que estos mueren en rigor, siendo probable que causen una contracción sostenida de la microcirculación (Hall *et al.*, 2014). La contracción capilar es capaz de impedir la circulación de las células sanguíneas y promover su agregación (Sandoval and Witt, 2008; Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011). La hipoperfusión por lo tanto contribuye a la inflamación y a las fases posteriores de permeabilidad de la BHE.

### 3.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la alteración del equilibrio fisiológico entre el estado prooxidativo y el antioxidante. Durante la I/R se crea un desequilibrio entre los radicales libres generados y la capacidad del tejido para desintoxicarse (Granger and Kviety, 2015). Los radicales libres, especialmente los derivados del oxígeno ROS, que son generados durante los diferentes procesos de la cascada isquémica y durante la reperfusión, son los mediadores fundamentales del daño por reperfusión (Maier *et al.*, 2006). Los ROS son pequeñas moléculas altamente reactivas porque tienen electrones no emparejados, los principales son el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Fisiológicamente se ha demostrado que los ROS son beneficiosos y juegan un papel en la señalización celular, en la inmunidad, en la apoptosis y en la descomposición de compuestos tóxicos, sin embargo, bajo condiciones de I/R los ROS se acumulan a niveles tóxicos, dando como resultado daño celular y tisular.



El estrés oxidativo causado por la I/R ha sido vinculado a diferentes fuentes de ROS, incluyendo fuentes no enzimáticas, como la autooxidación de hemoglobina y mioglobina (Allen and Bayraktutan, 2009), o los ROS provenientes de una o varias enzimas (fuentes enzimáticas). Los ROS son capaces de reducir el oxígeno molecular para formar  $O_2^-$  y/o  $H_2O_2$  (Granger and Kvietys, 2015). Además, la isquemia disminuye la actividad de numerosos sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), encargadas de reducir los niveles de ROS (Schaller and Graf, 2004b). Bajo condiciones normales la respiración mitocondrial libera una pequeña cantidad de electrones que pueden reaccionar con el  $O_2$  formando  $O_2^-$  que es convertido por la SOD en  $H_2O_2$ , este será procesado por la CAT o GPx que genera  $H_2O$  (Chance, Sies and Boveris, 1979). Después de la I/R estos mecanismos se alteran y los ROS se acumulan en el espacio intra y extracelular reaccionando con los diversos componentes celulares (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos) de forma indiscriminada. Además, el radical  $O_2^-$  se produce en el tejido por diversas reacciones enzimáticas y fuentes que incluyen componentes mitocondriales y enzimas oxidativas (xantina oxidasa (XO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), oxidasa y ciclooxigenasas (Crack and Taylor, 2005; Allen and Bayraktutan, 2009; Granger and Kvietys, 2015). El  $OH^-$  es generado a partir del  $H_2O_2$  en presencia de hierro ferroso que ha sido reducido por el  $O_2^-$  (Margail, Plotkine and Lerouet, 2005; Allen and Bayraktutan, 2009). El metabolismo de los ácidos grasos libres ocasionado por la lipólisis celular también es otra fuente de  $O_2^-$  durante la reperfusión (White *et al.*, 2000). Los pericitos son una fuente importante de ROS durante la I/R (Dalkara, Gursoy-Ozdemir and Yemisci, 2011).

Además de los ROS, también están las especies reactivas de nitrógeno (RNS). El radical óxido nítrico ( $NO^-$ ) se genera en el tejido por las tres isoformas de la óxido nítrico sintetasa (NOS): la forma neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS), que metabolizan la L-arginina a L-citrulina (Granger and Kvietys, 2015). nNOS y eNOS generan pequeñas cantidades de NO relacionado con la regulación de la señalización neural, la presión arterial, la relajación del músculo liso y la vigilancia inmunológica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la iNOS inducida por la inflamación y la I/R producen mayores cantidades de NO que son potencialmente dañinas para la célula y los tejidos (Granger and Kvietys, 2015). El NO es hidro- y liposoluble, por lo tanto, se difunde fácilmente a través del citoplasma y de las membranas plasmáticas. La interacción del radical de oxígeno con el NO puede producir ácido peroxinitroso (ONOOH) que se descompone espontáneamente para producir  $OH^-$  (Allen and Bayraktutan, 2009). Este ácido es una molécula de reactividad equivalente a la del radical  $OH^-$ . La interacción de NO con el  $O_2^-$  también puede formar el potente agente oxidante peroxinitrito (ONOO $^-$ ) que puede causar la fragmentación del ADN y la peroxidación lipídica (Allen and Bayraktutan, 2009). El ONOO $^-$  oxida grupos sulfhidro a un ritmo mil veces superior que el  $H_2O_2$  e inhibe la función de diversas enzimas, especialmente las de la cadena mitocondrial (Pryor and Squadrito, 1995). El peroxinitrito induce nitrotirosinación de proteínas, un cambio irreversible que puede alterar la funcionalidad de proteínas, tal como se ha descrito para el fibrinógeno después del ictus (ILL-Raga *et al.*, 2015). También puede producir el catión nitrosonio ( $NO^+$ ) y el anión nitroxilo ( $NO^-$ ).

Por otra parte, se ha demostrado que la reperfusión tiene efectos sobre los componentes musculares de la microvasculatura cerebral debido al estrés oxidativo (Bastide *et al.*, 2007). Afecta el tono vascular y especialmente el peroxinitrito, induce contracción de los pericitos (Yemisci *et al.*, 2009), causando una disminución del FSC después de la reperfusión que desencadena un aumento de la agregabilidad plaquetaria (Eltzschig and Collard, 2004; Allen and Bayraktutan, 2009) y leucocitaria (Justicia *et al.*, 2003; Eltzschig and Eckle, 2011; Amaro *et al.*, 2015). El estrés oxidativo y la inflamación producen un círculo vicioso en el desarrollo de la

I/R, ya que así como los ROS contribuyen al aumento de citocinas y quimioquinas que atraen leucocitos al tejido afectado, a su vez las células inflamatorias también contribuyen a la producción de radicales libres, como se observa en la Fig. 14.

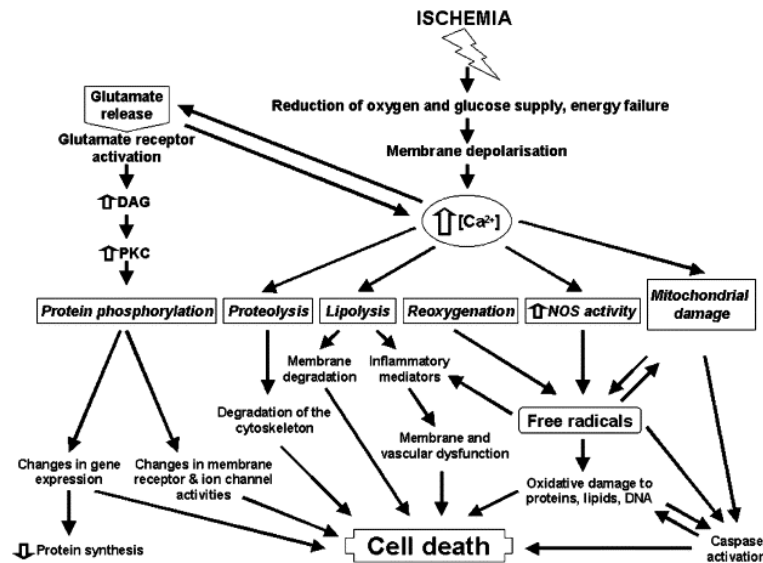


Fig. 14. Mecanismos de la I/R implicados en la producción de radicales libres y su interacción con los diversos procesos que producen la muerte celular. Adaptado de Crack & Taylor 2005

La producción de radicales libres y peroxinitrito aumenta de forma precoz tras el evento isquémico y se puede duplicar su producción tras la reperusión (White *et al.*, 2000; Schaller and Graf, 2004b; Granger and Kvietys, 2015). El cerebro es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a que posee altas concentraciones de lípidos peroxidables, niveles bajos de antioxidantes protectores, alto consumo de oxígeno y altos niveles de hierro que actúan como prooxidantes en condiciones patológicas. Los ROS y RNS tienen diversos efectos destructivos que terminan con la desintegración de los tejidos y la muerte celular (Fig. 14). Estos efectos incluyen la peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas, la inactivación de enzimas, el daño de ácidos nucleicos y del ADN, la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el daño estructural del citoesqueleto e inducen la síntesis de factores de transcripción que incrementan la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (Crack and Taylor, 2005; Margail, Plotkine and Lerouet, 2005; Allen and Bayraktutan, 2009; Lakhan *et al.*, 2009; Olmez and Ozyurt, 2012; Chamorro *et al.*, 2016). Los radicales libres también estimulan la activación del complemento, las plaquetas y la célula endotelial, promoviendo un estado procoagulante (Vidale *et al.*, 2017), estimulan la activación de leucocitos y provocan la producción de eicosanoides ( $\text{TxA}_2$  y  $\text{LTB}_4$ ) (Eltzschig and Collard, 2004), que en conjunto median la infiltración leucocitaria al cerebro.

### 3.2 Infiltración leucocitaria

Los procesos de la cascada isquémica desencadenan la producción de moléculas proinflamatorias, como citoquinas, quimioquinas y eicosanoides, que a su vez inducen la expresión de moléculas de adhesión. En conjunto, todos estos mediadores se consideran los amplificadores de la respuesta inflamatoria producida por la I/R (Tabla 3).

Estos mediadores, junto con las modificaciones estructurales de la ECM de la microvasculatura causadas por la I/R, promueven la activación, agregación e infiltración de



leucocitos al tejido cerebral. Se ha observado que el reclutamiento de leucocitos en las vénulas poscapilares está acompañada por el acúmulo de plaquetas (Arumugam, Granger and Mattson, 2005; Stoll, Kleinschnitz and Nieswandt, 2008; Brait *et al.*, 2012). El reclutamiento de plaquetas y leucocitos en el endotelio cerebral se considera un paso importante, coordinado y muy regulado en el desarrollo del daño por inflamación relacionado con la I/R (Yilmaz and Granger, 2008).

Tabla 3. Medidores de la inflamación postisquémica. Modificado de Vidale *et al.* 2017

Mediator	Type	Producing cell
IL-1	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
IL-6	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
IL-10	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
IL-17	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
IL-20	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
TNF	Cytokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
CCL2	Chemokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
CCL3	Chemokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
CCL5	Chemokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
CXCL2/3	Chemokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
CXCL8	Chemokine	EC, neurons, PVM, MG, AG
MMP2	Protease	Circ, EC, AG, neurons
MMP9	Protease	Circ, EC, AG, neurons
Complement	Protease	Circ, EC, AG, neurons
iNOS	Other mediator	MG, Leuk, EC
COX-2	Other mediator	Neurons, MG, Leuk, EC
ICAM1	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG
VCAM-1	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG
P-selectin	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG
E-selectin	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG
Mac-1	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG
VLA-1	Adhesion molecule	EC, Leuk, PVM, MG, AG

Leyenda: AG: astrogliá, EC: célula endotelial, MG: microglía, PVM macrófago perivascular, Circ: plasma.

### 3.2.1 Moléculas de adhesión

Los capilares cerebrales actúan de interfaz para que los leucocitos se adhieran al endotelio y luego accedan al parénquima (del Zoppo *et al.*, 2000) como se refleja en la Fig. 15. La trans migración de leucocitos desde la microcirculación hasta el núcleo isquémico se puede observar tras la primera hora de isquemia (del Zoppo and Mabuchi, 2003), pero la adhesión de leucocitos al endotelio se ha observado a partir de los 30 minutos después de la reperfusión (Yilmaz and Granger, 2008).

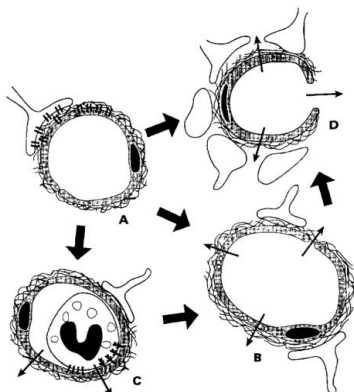


Fig. 15. Respuesta de la microvasculatura cerebral a la isquemia focal (A), después de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), aumenta la permeabilidad de la célula endotelial y de los componentes de la BHE (B), se produce la adhesión de leucocitos y plaquetas a los receptores expresados por las células endoteliales (C) y la pérdida de inserciones en ECM de las células endoteliales y de los extremos del astrocito, produciendo la ruptura de la lámina basal (D). Tomado de del Zoppo *et al.* 2000

Las moléculas de adhesión celular (CAMs), que están presentes en el endotelio vascular, en los leucocitos y las plaquetas, son las mediadoras clave en el rodamiento, adherencia y migración de los leucocitos al cerebro (Iadecola and Alexander, 2001). Estas moléculas se clasifican en 3 familias: las selectinas, la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) y las integrinas.

- Las selectinas son glicoproteínas que median la adhesión célula-célula y el rodamiento de los leucocitos en el endotelio (Frijns and Kappelle, 2002; Wang, Tang and Yenari, 2007). Se conocen 3 selectinas: P-selectina, E-selectina y L-selectina. Estas se expresan en la membrana celular inmediatamente tras la activación de la célula. La E-selectina (CD62E) se expresa en la célula endotelial tras la activación por citoquinas. La P-selectina (CD62P) está constitutivamente presente en las membranas de los gránulos de las células endoteliales y las plaquetas, lo que permite su expresión extracelular inmediata tras la activación de la célula por medio de histamina, trombina o por el complemento (Frijns and Kappelle, 2002; Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). La P-selectina se ha detectado 15 minutos tras la reperfusión después de la isquemia cerebral (Yilmaz *et al.*, 2006). Se ha postulado que las plaquetas activadas liberan P-selectina para interactuar con los leucocitos por medio del receptor PSGL1 y potenciar el daño vascular (Goussev *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 2002; Arumugam, Granger and Mattson, 2005; Yilmaz and Granger, 2008).

La diana de la E y P selectina endotelial es el receptor PSGL1 de los leucocitos y su función es la adhesión primaria (llamado rodamiento). El rol de la L-selectina en la isquemia es menos claro y parece no influenciar el resultado de la misma. La L-selectina se expresa en los linfocitos, neutrófilos y monocitos (Wang, Tang and Yenari, 2007), y parece que media la unión de neutrófilos al endotelio por vías independientes a las integrinas (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006).

Diversos estudios demuestran que la sobreexpresión de las selectinas P y E promueve la inflamación y el daño isquémico (Connolly *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2000), así mismo el uso de ratones genéticamente modificados para que no expresen alguna selectina, o el uso de inhibidores o anticuerpos contra las selectinas, se asocian con una mejoría en la evaluación neurológica y un menor volumen de infarto (Suzuki *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Mocco *et al.*, 2002; Yilmaz and Granger, 2008), inclusive se relacionan con una reducción de la transformación hemorrágica en ratas (Goussev *et al.*, 1998).

- La superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) se expresa en las células endoteliales activadas. Estas median la adhesión firme entre los leucocitos y el endotelio y a la vez activan los leucocitos. Esta familia está compuesta por 5 moléculas: molécula de adhesión intercelular 1 y 2 (ICAM-1 e ICAM-2), molécula de adhesión vascular-celular 1 (VCAM-1), molécula de adhesión plaqueta-endotelio 1 (PECAM-1) y MADCAM-1, que se describen en la Tabla 4. La ICAM1 y la VCAM1 son las más estudiadas en la I/R. Aunque son expresadas constitutivamente, su expresión puede ser aumentada por citoquinas. En humanos también han sido detectadas estas 2 CAMs después del ictus (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). En modelos animales usando anticuerpos anti-ICAM-1 y en ratones deficientes en ICAM-1 se observa una disminución en el tamaño del infarto y una mejoría en la recuperación (Bowes *et al.*, 1995; Chopp *et al.*, 1996; Connolly *et al.*, 1996; Kanemoto *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2003; Merchant, Gurule and Larson, 2003). Sin embargo, un ensayo clínico en 625 pacientes con ictus isquémico tratados con un

anticuerpo anti-ICAM-1 (Enlimomab) o placebo administrados con una ventana terapéutica de 6 horas, no resultó ser eficaz para el tratamiento del ictus isquémico y los pacientes tratados presentaron una peor recuperación funcional (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001a).

El rol de la VCAM-1 es menos claro, algunos estudios demuestran como la reducción de la expresión de VCAM-1 se relaciona con menor respuesta inflamatoria tras la isquemia (Cervera *et al.*, 2004), o con mejora del déficit neurológico (Zhang and Wei, 2003). Mientras que en otro estudio experimental se observó que el uso de anticuerpos anti-VCAM-1 no producía una mejoría en la recuperación después del episodio isquémico (Justicia *et al.*, 2006).

La PECAM-1 y la ICAM-2 se expresan en el endotelio y las plaquetas (la PECAM-1 también en los leucocitos) y podrían mediar las interacciones intercelulares durante la inflamación y la trombosis (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). La función de la PECAM-1 es la unión intercelular de las células endoteliales por lo que es importante en la transmigración de los leucocitos a través del endotelio (Frijns and Kappelle, 2002).

Tabla 4. Moléculas de adhesión relacionadas con la infiltración leucocitaria. Familia de Ig e integrinas presentes en los leucocitos.

Adhesion Molecule	Action	Cells of Origin	Expression	Counterreceptor	Target Cells
<b>Immunoglobulin gene superfamily</b>					
ICAM-1, CD54	Firm adhesion and transmigration	EC, leukocytes, fibroblasts, epithelial cells	Constitutive (low), upregulated by cytokines	LFA-1, Mac-1	All leukocytes
ICAM-2, CD102	Firm adhesion	EC, platelets	Constitutive	LFA-1	All leukocytes
VCAM-1, CD106	Firm adhesion and transmigration	EC	Constitutive (low), upregulated by cytokines	VLA-4	Monocytes, lymphocytes
PECAM-1, CD31	Leukocyte transmigration and adhesion	EC, platelets, leukocytes	Constitutive	PECAM-1	EC, platelets, leukocytes
<b>β2 (CD18) integrins</b>					
CD18/11a (LFA-1)	Firm adhesion and transmigration	All leukocytes	Constitutive, function on leukocyte activation	ICAM-1 and ICAM-2	EC
CD18/11b (Mac-1)	Firm adhesion and transmigration	Neutrophils, monocytes, NK cells	Constitutive, surface expression increased after activation	ICAM-1	EC
CD18/11c	Minor role in leukocyte adhesion	Neutrophils, monocytes, NK cells	Constitutive, surface expression increased after activation	Complement fragments	
<b>β1 (CD29) integrins</b>					
VLA-4, CD49d/CD29	Firm adhesion and transmigration	Lymphocytes, monocytes		VCAM-1	Monocytes, macrophages, EC, epithelial

Leyenda: EC: células endoteliales. Modificada de Frijns & Kappelle 2002

- Las integrinas son glicoproteínas de membrana heterodiméricas presentes en la superficie de las células, que están compuestas por una subunidad β común y una subunidad α variable. Hay 3 subfamilias de la subunidad β: las integrinas β1 se unen al colágeno, laminina y fibronectina y están relacionadas con la estructura de la ECM procurando la unión de las células endoteliales a la matriz. Las integrinas β3 o citoadhesinas están relacionadas con la formación del coágulo y la estabilización del

mismo, incluyen la GPIIb/IIIa (CD61) de la plaqueta (Wang, Tang and Yenari, 2007; De Meyer *et al.*, 2016).

La subfamilia  $\beta 2$  (CD18) de las integrinas son CAMs que se expresan únicamente en los leucocitos. Su expresión aumenta en presencia del TNF $\alpha$  y la E-selectina (Frijns and Kappelle, 2002). Dentro de la subfamilia  $\beta 2$  hay 3 subunidades  $\alpha$  (CD11a, CD11b y CD11c), ver Tabla 4. Las integrinas más relacionadas con la infiltración leucocitaria son la CD18/CD11a o LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función del linfocito) y la CD18/CD11b o Mac-1 (antígeno del macrófago 1), estas se unen a las ICAMs. Los linfocitos y los monocitos además expresan la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) que se une a la VCAM-1. En general las integrinas se unen a sus receptores de la IgSF en el endotelio, esta unión promueve la adhesión firme y colabora en la transmigración de las células desde el lumen de los vasos al parénquima cerebral. Las integrinas actúan como el principal mediador celular de las cascadas inflamatorias experimentadas durante la isquemia (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). Diversos estudios demuestran que bloquear las integrinas reduce el daño neurológico en modelos animales y es asociado a menor infiltración de neutrófilos (Bowes *et al.*, 1995; Yenari *et al.*, 1998; Prestigiacomo *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2001; Yilmaz and Granger, 2008). En particular, hemos participado en un estudio multicéntrico, aleatorizado y ciego (Llovera, Hofmann, Roth, Salas-Perdomo, Ferrer-Ferrer, Perego, E. R. Zanier, *et al.*, 2015), en el que se testaba un anticuerpo contra la cadena  $\alpha 4$  del VLA-4, el anticuerpo anti-CD49d, en los modelos permanentes y transitorios de MCAO. Los resultados demostraron que en el modelo de isquemia permanente había una neuroprotección ya que disminuía significativamente el volumen de infarto y había menor infiltración leucocitaria, mientras que en el modelo de isquemia transitoria no había diferencias significativas (el estudio completo se encuentra en el Anexo A). Recientemente se ha completado un ensayo clínico (ACTION trial) en pacientes con ictus isquémico agudo utilizando un anticuerpo humanizado contra la integrina  $\alpha 4$  (Natalizumab) que se administró en las primeras 9 horas después del inicio del ictus (Elkins *et al.*, 2017a). Aunque el tratamiento no redujo de forma significativa el volumen de infarto cerebral, sí que se asoció con una mejora de la función neurológica a los 90 días. No obstante, un segundo ensayo clínico con Natalizumab en pacientes con ictus isquémico, no ha dado resultados positivos, según comunicado reciente de Biogen, la empresa financiadora del estudio. Por lo tanto, se necesitan nuevos estudios clínicos para determinar si los fármacos que atenuan la infiltración leucocitaria conllevan una mejora del pronóstico de los pacientes con ictus.

Además de que la adhesión de leucocitos al endotelio permite que estos migren al cerebro, la adhesión de leucocitos y su interacción con las plaquetas, produce tapones microvasculares que disminuyen la velocidad y la cantidad del FSC empeorando así el daño isquémico.

### 3.2.2 Leucocitos infiltrantes

Existen extensas evidencias de la variedad de poblaciones celulares que se adhieren a la vasculatura y migran al espacio perivascular de varios tejidos (corazón, intestino, pulmón, cerebro, etc.) después de la I/R. Los leucocitos infiltrantes actúan sinérgicamente con la microglía activada produciendo diversos mediadores inflamatorios, resultando en edema cerebral, hemorragia, daño a la BHE y mayor muerte neuronal (Gu *et al.*, 2015).

Dentro del estudio de los leucocitos se ha dado mayor importancia a los neutrófilos. Estos se adhieren a las venas poscapilares minutos después de la reperfusión, sin embargo se requieren horas y/o días para detectar neutrófilos infiltrados en el parénquima. Linfocitos de diversas poblaciones (T, B y NK), macrófagos y monocitos también han sido observados en diversos órganos posreperfusión (Fig. 16).

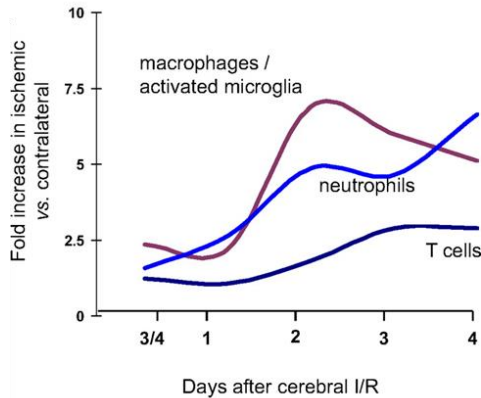


Fig. 16. Esquema que muestra el reclutamiento de las células inflamatorias en el cerebro después de la isquemia cerebral focal en ratones en un periodo del tiempo. Tomado de (Jin, Yang and Li, 2010)

Los neutrófilos son las primeras células que responden al daño isquémico, estos acuden al cerebro desde los 30 minutos hasta pocas horas después del episodio isquémico. Estudios clínicos han confirmado el acumulo de neutrófilos en las regiones infartadas del cerebro humano, y se correlacionan con un mayor daño del tejido y peor recuperación funcional (Price *et al.*, 2004; Buck *et al.*, 2008; Perez-de-Puig *et al.*, 2015).

En modelos de isquemia transitoria se ha demostrado mediante deplección o inhibiendo su infiltración, que una mayor cantidad de neutrófilos infiltrantes en el cerebro causan mayores volúmenes de infarto, (Bowes *et al.*, 1995; Chopp *et al.*, 1996; Connolly *et al.*, 1996; Yenari *et al.*, 1998). Los neutrófilos contribuyen al daño secundario ya que liberan citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, elastasas, MMPs, ROS y aumentan la expresión de las CAMs (Iadecola and Alexander, 2001; Wang, Tang and Yenari, 2007; Jin, Yang and Li, 2010). Los neutrófilos son una fuente muy importante de MMP9, una proteasa que degrada la lámina basal y media la ruptura de la BHE, exacerbando el daño isquémico (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006; Jin, Yang and Li, 2010) y la transformación hemorrágica del infarto (Rosell *et al.*, 2008).

Los monocitos/macrófagos son morfológica y funcionalmente similares a la microglía residente y por lo tanto muy difíciles de distinguir entre sí. La mayoría de los datos actuales han demostrado que los macrófagos se reclutan en el cerebro isquémico entre los 3 y 7 días después de la isquemia (Schilling *et al.*, 2005, 2009; Breckwoldt *et al.*, 2008) y los monocitos entre 4 y 7 días, aunque durante el primer día ya se observen algunos monocitos infiltrantes (Miró-Mur *et al.*, 2016). El estudio de los efectos independientes de cada tipo celular en el cerebro isquémico es difícil y existen muchas controversias debido a que todas las células parecen tener efectos detrimentales, pero a la vez pueden contribuir a la resolución de la inflamación y a la reparación del tejido.

### 3.2.2.1 Los linfocitos

Recientemente muchos científicos y clínicos han centrado su atención en la participación de los linfocitos en el ictus. Los linfocitos son actores importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa (Urra *et al.*, 2009). Existen evidencias de que los linfocitos pueden jugar un

rol negativo en la patogénesis de la isquemia, sin embargo hay controversias, y se requiere un estudio más amplio sobre los mecanismos y las subpoblaciones involucradas en el desarrollo del daño por I/R. Por ejemplo, en un estudio clínico en pacientes, se determinó que tras sufrir un ictus el aumento de algunas subpoblaciones de linfocitos en sangre se podía correlacionar con un mayor riesgo de recurrencia del ictus y con la muerte (Nadareishvili *et al.*, 2004). Sin embargo, se conoce que en pacientes que sufren un ictus se produce linfopenia y esta se relaciona con el desarrollo de infecciones asociadas al ictus (SAI), aumentando la morbilidad y mortalidad de esta patología (Prass *et al.*, 2003; Chamorro, Urra and Planas, 2007; Urra *et al.*, 2009; Iadecola and Anrather, 2011). Aunque los linfocitos presentan fuertes propiedades dañinas para el tejido y propiedades proinflamatorias, también están implicados en el equilibrio de la respuesta inmunológica y en la reparación tisular y esto depende de la subpoblación a la que pertenecen y las características que desarrollan tras su activación.

Aunque los linfocitos son similares morfológicamente, son muy diferentes en sus funciones y deben clasificarse para su correcto estudio. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos y son el componente central de la inmunidad humoral. Diversos estudios en modelos animales han reportado que los linfocitos B no contribuyen al daño isquémico tras el ictus (Kleinschnitz *et al.*, 2010; Iadecola and Anrather, 2011; Gu *et al.*, 2015) y que en animales deficientes en células B no se alteran la dinámica del infarto ni de la inflamación (Yilmaz *et al.*, 2006). Sin embargo estudios recientes muestran que los linfocitos B son protectores, ya que en animales deficientes en linfocitos B o tratados con anticuerpo anti-CD22 se observó un mayor volumen de infarto, y se demostró que la protección ante la isquemia está ligada a la producción de IL10 por parte de los linfocitos B (Offner and Hurn, 2012; Bodhankar *et al.*, 2013). No obstante, aunque se ha demostrado que en condiciones de inflamación puede haber tráfico de linfocitos B sin ruptura de la BHE, no hay evidencias de que estas células participen en la fase aguda del ictus isquémico (Miller, 1999).

Los linfocitos T son los mediadores de la inmunidad celular. Las células T juegan un papel central en la inmunidad adaptativa, son importantes en la comunicación entre el sistema inmune innato y adaptativo (Gu *et al.*, 2015) y pueden generar memoria inmune (Brait *et al.*, 2012). Los linfocitos T activados son capaces de cruzar la BHE de una forma aleatoria, sin importar el tipo de célula T y sin influencia de un antígeno específico (Miller, 1999). Se ha observado que el perfil temporal de las células T en el daño isquémico no es consistente con los conceptos establecidos de la inmunidad adaptativa, ya que esta respuesta requiere un intervalo de 7 a 10 días desde la presentación del antígeno (Iadecola and Anrather, 2011) y las células T han sido observadas en el cerebro isquémico pocas horas tras la reperusión (Arumugam, Granger and Mattson, 2005; Brait *et al.*, 2010; Jin, Yang and Li, 2010). Por lo tanto, diversos estudios sugieren que en la fase aguda de la isquemia, los linfocitos T contribuyen al daño tisular de manera independiente del antígeno, ya sea, por medio de la liberación de diversas citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, de producción de ROS e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), activando las CAMs, las células residentes, los macrófagos y otros leucocitos, que finalmente, en conjunto causan la muerte neuronal (Arumugam, Granger and Mattson, 2005; Zipp and Aktas, 2006; Brait *et al.*, 2010; Kamel and Iadecola, 2012).

Las acciones precisas de los linfocitos T en el cerebro después del accidente cerebrovascular no se conocen bien y es probable que sean complejas y específicas para las diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T se caracterizan por la expresión del receptor de la célula T (TCR) y se pueden diferenciar por la expresión de proteínas correceptoras específicas. El 95% de las células T expresan en su superficie CD3 (Brait *et al.*, 2012). El subconjunto CD3+ está compuesto por las células CD4+ (o células T helper; Th) y



células CD8+ (o células T citotóxicas; Tc). Las células T CD4+ y CD8+ son las células más implicadas en la inflamación tras la isquemia de diversos órganos en modelos animales (Jin, Yang and Li, 2010). Ver Fig. 17.

Las células T CD4+ o Th son células efectoras que no tienen funciones citotóxicas, sino que actúan como ayudantes coordinando y modulando la respuesta inmune. El TCR de las células Th reconoce el antígeno presentado por el complejo de histocompatibilidad (MCH) clase II y esta interacción produce la activación de las células T. Dependiendo del medio donde se encuentren y las señales moleculares que reciben, las células Th se desarrollan para producir un patrón específico de citoquinas y se clasifican según esta producción.

- Las células Th1 secretan INF- $\gamma$  y TNF y su desarrollo lo promueve la IL12. Estas células estimulan la respuesta inmune innata y celular o inmunidad inflamatoria.
- Las células Th2 secretan citoquinas antiinflamatorias (IL4, IL5, IL9, IL10 e IL13) y se desarrollan por la presencia de IL4. Promueven la inmunidad humoral y la respuesta contra los patógenos extracelulares.
- Las células Th17 que secretan IL17, IL21 e IL22 (Brait *et al.*, 2012) se desarrollan en presencia de TGF- $\beta$  e IL6. Participan en la autoinmunidad y no han sido implicadas en el daño isquémico cerebral (Iadecola and Anrather, 2011).
- Las células T reguladoras (Treg; CD4+CD25+FoxP3+) o células T supresoras pueden estar presentes naturalmente o desarrollarse a partir de otras células Th en presencia de TGF- $\beta$ . Las células Treg secretan TGF- $\beta$  y principalmente IL10, que son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune ya que limitan la respuesta inflamatoria (Lakhan *et al.* 2009) (Fig. 17). En modelos animales se ha visto que las células Treg tienen un rol protector en los estadios crónicos de la isquemia, aunque su efecto beneficioso solo es evidente en isquemias pequeñas (Liesz *et al.*, 2009; Iadecola and Anrather, 2011).

Las células CD4+ activadas infiltran el cerebro fácilmente después de la I/R, dando la oportunidad a las células dendríticas, la microglía o los macrófagos de estimular estas células y potenciar su diferenciación hacia células Th1 para producir citoquinas proinflamatorias o Th2 que dan soporte a la respuesta mediada por anticuerpos. Además se ha observado que las células T nativas que aún no tienen un fenotipo específico, en condiciones de inflamación cerebral, son capaces de penetrar la BHE y causar daño por medio de la producción de citoquinas (Arumugam, Granger and Mattson, 2005). También se ha advertido que las células Th son capaces de viajar grandes distancias dentro del cerebro en condiciones de inflamación, para interactuar con las neuronas e inducir las a morir (Infante-Duarte *et al.*, 2008) (Fig. 17).

Las células CD8+ o Tc son células citotóxicas. El TCR de las células Tc se une al antígeno presentado por el MCH clase I que está presente en todas las células somáticas. La célula Tc puede matar la célula somática a través de la permeabilización de la membrana por medio de la liberación de perforina y de varias granzimas, produciendo la muerte celular por necrosis o apoptosis. Las células Tc también producen citoquinas como INF- $\gamma$  y TNF que pueden activar otros elementos del sistema inmune (Brait *et al.*, 2012) (Fig. 17).

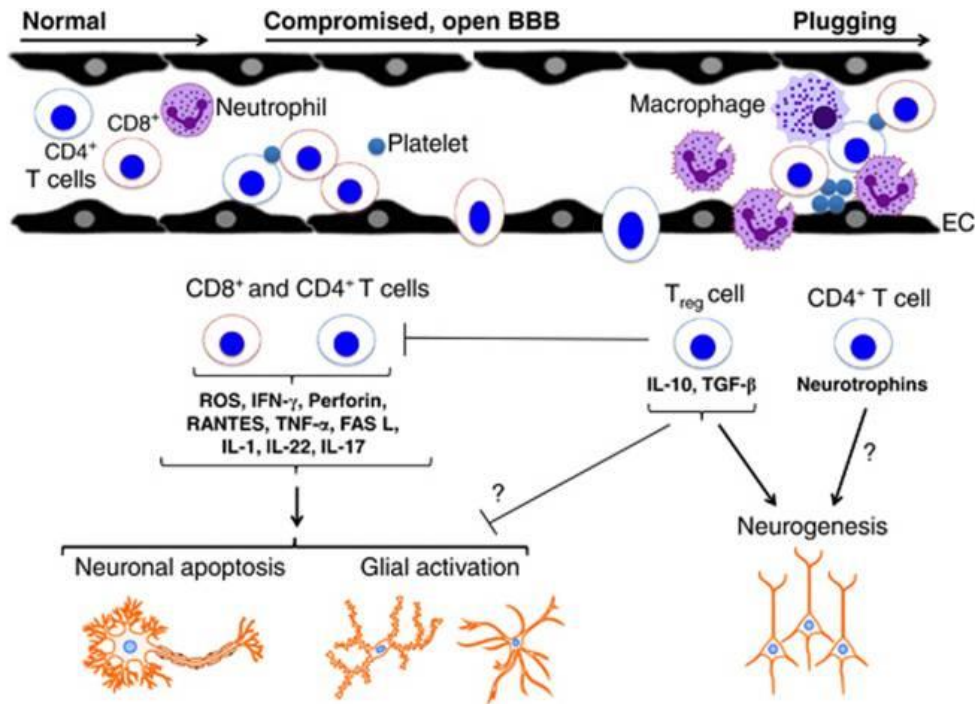


Fig. 17 Acciones potenciales de los linfocitos T en el cerebro después del ictus. Tras la I/R, los linfocitos T circulantes interactúan con neutrófilos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales (EC), y pueden atravesar la BHE para infiltrarse en el tejido. Hay dos amplias subpoblaciones de linfocitos T circulantes, células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Parece que ambas subpoblaciones contribuyen significativamente a la lesión postisquémica a través de diversos mecanismos. La pequeña subpoblación de células Treg puede actuar limitando los efectos perjudiciales causados por otras células T. Además, las células T CD4<sup>+</sup>, especialmente Tregs, pueden contribuir a procesos posteriores de reparación, como la neurogénesis, en la fase más crónica del ictus. Tomado de Brait et al. 2012

Las células  $\gamma\delta$ T son un subgrupo peculiar de células T efectoras que no requieren presentación clásica de antígeno. Estas células reaccionan ante señales de peligro producidas por las células estresadas. Las células  $\gamma\delta$ T han sido postuladas como productoras de IL17 y se relacionan con el daño isquémico pero intervienen durante los estadios crónicos del desarrollo del infarto (Shichita *et al.*, 2009; Kleinschnitz *et al.*, 2010; Iadecola and Anrather, 2011). Las células  $\gamma\delta$ T se observan en la zona infartada del cerebro hacia el cuarto día después del episodio de I/R (Jin, Yang and Li, 2010), aunque también se ha descrito su participación reclutando neutrófilos en la fase aguda del ictus (Gelderblom *et al.*, 2012; Benakis *et al.*, 2016).

Las células NK y NKT se clasifican como linfocitos pero tienen similitudes con los macrófagos (Urrea *et al.*, 2009). Las células NK no tienen TCR y no necesitan presentación de antígeno para su activación o función citotóxica. Las células NKT tienen un TCR muy simple que reconoce glicolípidos (Iadecola and Anrather, 2011). Estos dos tipos de linfocitos son células con funciones citotóxicas que producen grandes cantidades de citoquinas (interferones, ILs, TNF) tras su activación.

El estudio del papel de los linfocitos en el ictus experimental se ha llevado a cabo por medio del uso de ratones deficientes en linfocitos totales, en linfocitos T o en poblaciones específicas de linfocitos T. En general, los estudios han demostrado que los ratones deficientes en linfocitos tienen un menor volumen de infarto y mejor resultado funcional comparado con los animales nativos (Yilmaz *et al.*, 2006; Hurn *et al.*, 2007; Shichita *et al.*, 2009; Kleinschnitz *et al.*, 2010). El estudio de Hurn *et al.* (2007) en animales SCID, deficientes en linfocitos T y B, demostró que tras una isquemia transitoria de 90 minutos, los animales deficientes tenían menor volumen de infarto que los nativos. Así mismo otros estudios en animales deficientes en el gen de activación de la recombinasa (Rag1<sup>-/-</sup> o Rag2<sup>-/-</sup>) que tampoco presentan linfocitos T



ni B, han demostrado menores volúmenes de infarto y mejor recuperación funcional que los animales nativos, y que al administrar células T de ratones nativos a los animales deficientes esta protección se perdía (Yilmaz *et al.*, 2006; Shichita *et al.*, 2009; Kleinschnitz *et al.*, 2010). La expresión de moléculas proinflamatorias por parte de las células T infiltrantes podría ser la causa de un mayor daño cerebral (Brait *et al.*, 2010).

Así mismo, hay estudios en subpoblaciones de células T. Dos estudios en animales deficientes en células Th o Tc demuestran que los animales tienen un menor volumen de infarto y una reducción del déficit neurológico (Yilmaz *et al.*, 2006; Liesz *et al.*, 2011). Incluso un estudio demostró que el infarto se reducía en ratones deficientes en células Th1, pero se incrementaba en ratones deficientes en células Th2 (Gu *et al.*, 2015).

Otra forma de estudiar la función de los linfocitos es por medio de la inmunosupresión química. En un estudio en el modelo de tMCAO en ratas, al usar el agente FK506 o Tacrolimus, un fármaco inmunosupresor usado principalmente después de trasplantes alogénicos que reduce la actividad de células T y la transducción de la IL2, se observó que el volumen de infarto se reducía significativamente en las ratas tratadas (Brecht *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de otros inmunosupresores como la ciclosporina o el inhibidor de la activación de las células T rapamicina, no demostraron protección usando el mismo modelo animal (Bochelen, Rudin and Sauter, 1999; Phillis *et al.*, 2002).

Independientemente de la actividad citotóxica de los linfocitos T, las células T también pueden contribuir a la patofisiología del ictus isquémico propagando la formación de trombos (Li, 2008; Kleinschnitz *et al.*, 2010), participar en el reclutamiento temprano de neutrófilos y otros leucocitos en el tejido isquémico tras la reperusión (Arumugam, Granger and Mattson, 2005; Yilmaz *et al.*, 2006) e incrementar la expresión de CAMs. Además pueden dañar la microvasculatura del cerebro ya que los linfocitos T activados pueden producir MMPs que degradan la ECM (Brait *et al.*, 2012). Finalmente la suma de estas acciones puede desencadenar un ambiente proinflamatorio y protrombótico en el cerebro infartado que exacerbe el daño tisular.

### 3.2.2.2 Las plaquetas y su interacción con los leucocitos

Estudios recientes del tejido posisquémico han demostrado que generalmente el reclutamiento de leucocitos viene acompañado de la acumulación de plaquetas (Yilmaz and Granger, 2008). Esta acumulación puede ser paralela o incluso preceder a la de leucocitos, lo que sugiere que existen interacciones intercelulares entre linfocitos y plaquetas (Rodrigues and Granger, 2010).

Se conoce que las plaquetas pueden acumularse en la microvasculatura isquémica tras 30 minutos de reperusión en diversos órganos como el riñón (Chintala, Bernardino and Chiu, 1994), el hígado (Nakano *et al.*, 2008), y el cerebro: por ejemplo, en un modelo de isquemia cerebral de gatos, se observó que las plaquetas se acumulaban en los vasos de los 30 a 45 minutos posreperusión (Jafar *et al.*, 1989). Lo que aún no está muy claro es cuán importante es la interacción de las plaquetas con los leucocitos, ni cuál es la implicación neta de las plaquetas en el cerebro isquémico post-reperusión.

Se ha estimado que tras la I/R aproximadamente el 25% de las plaquetas se unen directamente al endotelio de la microvasculatura, pero el 75% restante se une a los leucocitos atrapados a la pared vascular (Rodrigues and Granger, 2010). Se han observado complejos de

plaquetas-leucocitos en humanos que se incrementan en pacientes con ictus isquémico agudo (McCabe *et al.*, 2005). La unión de las plaquetas a los leucocitos puede causar la activación de estos dos tipos celulares (Li, 2008; Yilmaz and Granger, 2008), estén involucrados en el trombo o no. La activación de las plaquetas y de los leucocitos causa que cada uno de los tipos celulares libere productos citotóxicos que exacerbaban el daño inflamatorio, como se observa en la Fig. 18.

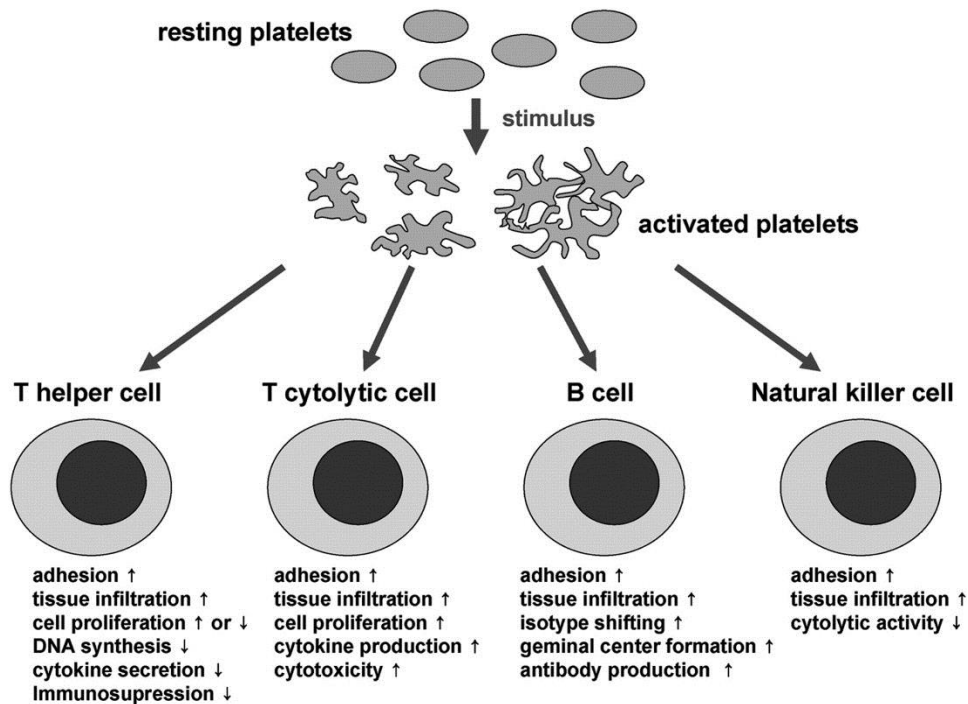


Fig. 18 Influencias de las plaquetas en la actividad de las diferentes subpoblaciones de linfocitos. Tomado de (Li, 2008)

Las interacciones plaquetas-leucocitos son mediadas por la P-selectina y el ligando PSGL-1 (CD162) (del Zoppo and Mabuchi, 2003). Se ha implicado el PSGL-1 (CD162) como el mayor contrareceptor para la P-selectina, VCAM-1 y las integrinas CD11/CD18 (Arumugam, Granger and Mattson, 2005). Las plaquetas aumentan el reclutamiento de linfocitos al tejido inflamado, ya que ofrecen una plataforma rica en P-selectina que puede interactuar con el PSGL-1 que se expresa en la superficie de algunos leucocitos (Afshar-Kharghan and Thiagarajan, 2006). Así mismo, las plaquetas se unen a los neutrófilos por este mecanismo y los activan, induciendo la liberación de proteasas por parte de los neutrófilos (De Meyer *et al.*, 2016). Igualmente, los linfocitos activados pueden interactuar con las plaquetas agregadas/activadas vía CD40/CD40L, un mediador de la trombo-inflamación (Kleinschnitz *et al.*, 2010; De Meyer *et al.*, 2016) y de la permeabilidad vascular observada en I/R (Rodrigues and Granger, 2010).

Las implicaciones de las interacciones plaquetas-leucocitos en la I/R aún no están esclarecidas ya que hay pocos estudios en isquemia cerebral. En modelos animales se ha observado que el bloqueo inmunológico de la integrina GPIIb/IIIa no ha tenido efecto en la adhesión plaquetaria causada por la I/R cerebral (Yilmaz and Granger, 2008). En estudios en ratones deficientes en linfocitos T CD4+ y CD8+ se observó un menor número de leucocitos y plaquetas adherentes en las vénulas cerebrales con un menor volumen de infarto (Yilmaz *et al.*, 2006). Sin embargo, en un estudio *in vitro* con sangre de ratones deficientes en linfocitos (Rag1-/-) se demostró que estos animales no mostraban alteraciones en el tiempo de formación del trombo (Kleinschnitz *et al.*, 2010).

Algunos estudios en órganos que han sufrido I/R, diferentes al cerebro, sugieren que la interacción de las plaquetas con los leucocitos puede afectar la función de la barrera endotelial. Un estudio de la vasculatura coronaria posreperusión indica que las plaquetas no están implicadas en el daño de la barrera endotelial causado por leucocitos (Reynolds and McDonagh, 1994). Mientras que otro estudio en el mismo tipo de tejido, describe que al administrar plaquetas activadas, la función de la barrera endotelial mejora y se observan menos trasudados capilares (Heindl *et al.*, 1998). Un estudio en isquemia pulmonar también demuestra que las plaquetas pueden tener un efecto protector de la barrera endotelial (Zamora, Baron and Heffner, 1991). Por lo tanto, hay resultados muy diferentes sobre las plaquetas y sus interacciones con los leucocitos en el ictus y es un tema que se debe seguir investigando ya que podría ser una interesante diana terapéutica.

Aparte de que las plaquetas están relacionadas con el fenómeno de “no reflujo” discutido con anterioridad y con el patrón trombo-inflamatorio que pueden generar, las plaquetas pueden facilitar la formación de mediadores inflamatorios de las células endoteliales por medio del intercambio transcelular de metabolitos precursores (Arumugam, Granger and Mattson, 2005) y pueden perjudicar la funcionalidad de la BHE ya que liberan citoquinas, ROS y otra gran cantidad de moléculas citotóxicas (Rodrigues and Granger, 2010).

### 3.3 Ruptura de la BHE

Los eventos de la cascada isquémica que se desarrollan en el ictus y los eventos de la reperusión son, en conjunto, los causantes de la ruptura de la BHE (Khatri *et al.*, 2012a). Durante la isquemia el desequilibrio osmótico, el acúmulo de glutamato y la acidosis láctica causan hinchazón de las células endoteliales, las neuronas y los astrocitos, ocasionando la pérdida de unión de las células que conforman la BHE con el consiguiente aumento de la permeabilidad. La respuesta inflamatoria induce la producción de COX-2 (Yang and Rosenberg, 2011) y de citoquinas que contribuyen al daño de la BHE. También aumenta la producción de radicales libres y proteasas que atacan y degradan la ECM y las proteínas de los complejos de uniones de la célula endotelial. Durante la reperusión el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria y el ingreso de leucocitos al parénquima contribuyen a la formación del edema y a la ruptura de la BHE. Además la reperusión incrementa la presión sobre las TJ y las células endoteliales dañadas (Baeten and Akassoglou, 2011). En general todos los procesos de la I/R culminan con la formación de proteasas tóxicas y radicales libres que participan en el daño al tejido y en la eliminación de las células muertas. Sin embargo, algunas de las moléculas que son dañinas en el estadio temprano de la patología pueden tener funciones esenciales en la fase de recuperación (Yang and Rosenberg, 2011).

El estrés oxidativo y los mediadores de la inflamación afectan a todos los componentes de la UNV y permiten la extravasación de proteínas y células sanguíneas, como se observa en la Fig. 19. La excesiva cantidad de ROS generados por las células endoteliales activadas, los leucocitos, las plaquetas adheridas y las células perivasculares, pueden iniciar la peroxidación de lípidos de las membranas generando daño en la integridad microvascular. La proteólisis es otra vía importante que está involucrada en el daño a la ECM (del Zoppo and Mabuchi, 2003). Comúnmente se considera que la alteración de las TJ desencadena la ruptura de la BHE, sin embargo un novedoso estudio en el modelo tromboembólico en ratas ha demostrado que la ruptura de la BHE es principalmente debida al daño directo de la célula endotelial y no solo a la degradación de las TJ (Krueger *et al.*, 2015). También la muerte del pericito ha sido implicada en la ruptura de la BHE (Hall *et al.*, 2014).

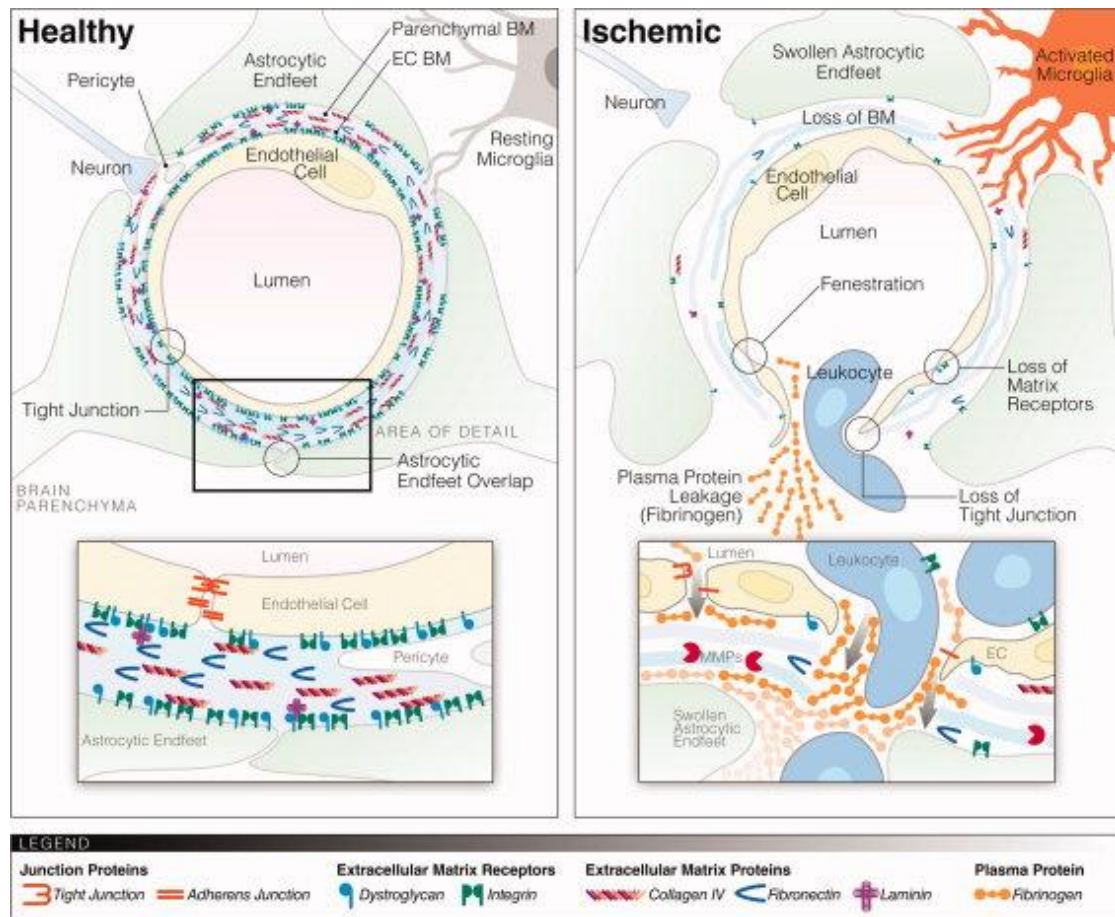


Fig. 19. Representación esquemática de la BHE antes y después de la isquemia. Después de la isquemia desaparecen las características endoteliales especializadas, se pierden los complejos de uniones y aparecen fenestraciones. La membrana basal se vuelve más delgada y hay una marcada reducción en las proteínas y receptores de la matriz. Hay fugas de líquido, proteínas y células de la luz del vaso. La microglía se activa y puede extender los procesos hacia los vasos sanguíneos, mientras que los pericitos se alejan y los glóbulos blancos transmigran. Tomado de Baeten & Akassoglou 2011

La respuesta del tejido a la I/R causa una multitud de efectos en la microvasculatura que incluyen: pérdida de la integridad microvascular, pérdida de la regulación de las TJ, cambios multifásicos en la permeabilidad, degradación proteolítica de la membrana basal, pérdida de integrinas, pérdida de adhesión celular, edema, deposición extracelular de proteínas del plasma y aumento de la inflamación. Notablemente todos estos procesos contribuyen a la ruptura de la BHE (Wang and Lo, 2003; Wang and Shuaib, 2007; Sandoval and Witt, 2008; Baeten and Akassoglou, 2011). La ruptura de la barrera ocurre principalmente por la degradación enzimática que se corresponde con el inicio de la fase bifásica de la permeabilidad vascular tras la reperusión (fases que se pueden observar en la Fig. 13, al inicio del capítulo 3) alrededor de las 5 horas posteriores a ella (Sandoval and Witt, 2008; Yang and Rosenberg, 2011). La ruptura de la BHE permite que los componentes del plasma y las células sanguíneas se extravasen con la consiguiente formación de edema vasogénico, transformación hemorrágica (TH) del infarto y aumento del daño al tejido.

Aproximadamente en un tercio de los pacientes con isquemia se puede observar ruptura de la BHE (Henning, Latour and Warach, 2008). La ruptura de la BHE en humanos se ha asociado principalmente a la terapia con rtPA. Después del tratamiento farmacológico para la revascularización, se ha observado que la ruptura es más frecuente en pacientes tratados que reperúden, que en pacientes en los que no hay reperusión (Pan *et al.*, 2007). La ruptura de la BHE es la precursora de consecuencias clínicas serias como la TH del infarto (Kassner and

Merali, 2015) y el edema, que aumentan el daño al tejido y empeoran el cuadro clínico. Los pacientes que presentan hipertensión o diabetes tienen mayor riesgo de presentar anomalías de la BHE y de un incremento de la permeabilidad/ruptura de la barrera tras el ictus (Yang and Rosenberg, 2011).

### 3.3.1 Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Durante la isquemia cerebral los componentes de la lámina basal de la microvasculatura desaparecen. Las proteínas de la matriz: laminina, colágeno, fibronectina y perlecan, se degradan por las proteasas que genera el tejido en respuesta a la isquemia. Experimentalmente se ha demostrado que en el territorio isquémico se produce una rápida aparición, alrededor de las primeras 2 horas, de las 4 familias de proteasas (MMPs, uroquinasa (u-PA), catepsinas y heparanasas) en la microvasculatura y cerca de las neuronas tras la MCAO (del Zoppo, 2010b). La u-PA es un activador del plasminógeno que a su vez activa la plasmina que es capaz de degradar todas las proteínas de la matriz (del Zoppo and Mabuchi, 2003). La catepsina L está relacionada con la degradación de la laminina y el perlecan (Baeten and Akassoglou, 2011). Las MMPs tienen la habilidad de digerir todas las proteínas de la lámina basal y de las TJ. La MMP2 o gelatinasa A y la MMP9 o gelatinasa B, digieren específicamente el colágeno IV (Wang and Lo, 2003; Gasche *et al.*, 2006) .

Las MMPs son endopeptidasas que se expresan en el tejido como formas latentes llamadas zimógenos, no son activas y no pueden degradar la ECM. Las MMPs son importantes para la remodelación de la ECM y el mantenimiento del equilibrio homeostático (Gasche *et al.*, 2006). Algunas MMPs se expresan constitutivamente y participan en procesos fisiológicos, como la MMP2 que está regulada principalmente por factores de crecimiento como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Yang and Rosenberg, 2011). Otras se inducen tras el daño por I/R como la MMP3 y la MMP9. Las citoquinas y el NO inducen la expresión de la MMP3 y la pro-MMP9.

En la isquemia cerebral las MMPs producidas en el cerebro (principalmente MMP2, 3 y 9) participan en la fase bifásica de permeabilidad de la barrera según sus características como se puede observar en la Fig. 20. La activación de la forma latente pro-MMP2 coincide con la fase inicial reversible y precede a la fase más tardía e irreversible que se asocia a la inducción de MMP3 y MMP9 (Yang and Rosenberg, 2011; Turner and Sharp, 2016). Esta fase tardía se asocia a la ruptura completa de la BHE y a la TH (Asahi *et al.*, 2001). Así mismo estas tres metaloproteasas promueven el proceso inflamatorio y oxidativo (ya que activan IL1 $\beta$ , ROS, NO, etc.), en un bucle de retroalimentación positiva que incrementa la producción de MMPs de las células (Gasche *et al.*, 2006; Khatri *et al.*, 2012b).

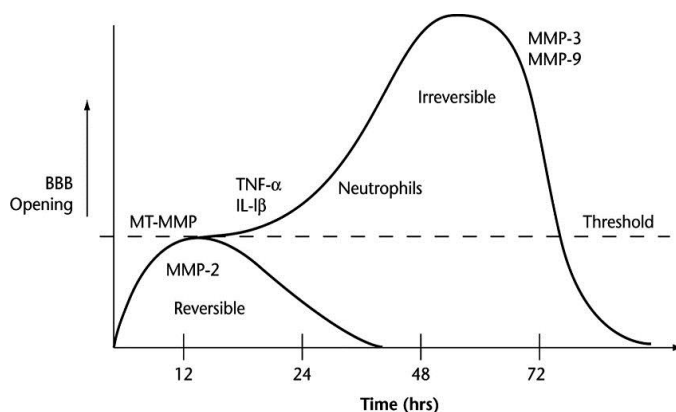


Fig. 20. Esquema de los mecanismos teóricos que conducen a la apertura de la BHE. La lesión por reperusión conduce a una apertura bifásica de la BHE. La apertura inicial es transitoria y reversible, se produce varias horas después del inicio de la reperusión debido a la activación de la enzima constitutiva gelatinasa A (MMP2). De 24 a 72 horas más tarde, la respuesta inflamatoria conduce a la inducción de MMP3 y MMP9, que incitan un daño más intenso e irreversible de los vasos sanguíneos. Tomado de Yang & Rosenberg 2011



La expresión de estas tres MMPs en la fase aguda de la isquemia está asociada a mayor daño del tejido, muerte celular y TH del infarto. En la fase más crónica del infarto, estas juegan un papel crítico en la reparación y remodelación del tejido, particularmente en la angiogénesis (Turner and Sharp, 2016).

Las MMPs son secretadas al espacio extracelular para ser activadas allí por un complejo sistema enzimático que requiere la interacción de unas con otras, al igual que con otras proteasas. La activación de los zimógenos depende de la escisión proteolítica del propéptido por medio de la autocatálisis (Florczak-Rzepka *et al.*, 2012) de forma directa o indirecta. La pro-MMP2 se activa por medio de la MT1-MMP, MT3-MMP y la plasmina (del Zoppo and Mabuchi, 2003; Gasche *et al.*, 2006). Los inhibidores de MMPs del tejido (TIMPs), son inhibidores endógenos intracelulares de las MMPs que tienen una alta afinidad por el dominio catalítico de las MMPs regulando su actividad. Curiosamente el zimógeno pro-MMP2 requiere la presencia del TIMP-2 que forma un complejo MT-MMP-TIMP2 indispensable para la activación de la MMP2.

La pro-MMP9 al sufrir la ruptura del pro-dominio pasa a su forma activa. Este zimógeno puede ser activado por diversas moléculas que incluyen MMP2, MMP3, plasmina, u-PA y tPA (Gurney, Estrada and Rosenberg, 2006; del Zoppo, 2010a; Turner and Sharp, 2016). De igual manera, la u-PA, el tPA y la plasmina pueden activar la MMP3. La MMP3 es capaz de digerir la mayoría de las proteínas de la ECM y de las TJ (Solé *et al.*, 2004; Gurney, Estrada and Rosenberg, 2006). Conjuntamente los factores de crecimiento vascular endotelial, las citoquinas y las quimioquinas pueden influenciar en la transcripción de las MMPs y los TIMPs.

Al mismo tiempo diversos estudios han demostrado que los leucocitos infiltrantes son una fuente importante de MMP9 activa (Planas *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2003) y que estos pueden causar la ruptura de la BHE (Gidday *et al.*, 2005a). La MMP9 ha sido la metaloproteasa más estudiada en el ictus clínico y experimental. En estudios experimentales, la MMP9 está asociada a la degradación de las proteínas de la ECM con el correspondiente desarrollo de edema y hemorragia (Wang and Lo, 2003). Los niveles de MMP9 activa aumentan hacia las 2 o 3 horas postisquemia y su pico es alrededor de las 18 horas (Gasche *et al.*, 2006; Turner and Sharp, 2016). La expresión de pro-MMP9 o su forma activa, ha sido detectada tras el ictus en primates (Heo *et al.*, 1999), en ratas (Planas *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008) y en ratones (Ogata *et al.* 1992; Gidday *et al.* 2005; Underly *et al.* 2017). La MMP9 es comúnmente asociada a isquemia focal en roedores, pero en primates solo se observa si hay TH del infarto (Asahi, Asahi, Jung, *et al.*, 2000).

Experimentalmente se ha demostrado que la MMP9 es la proteasa dominante que degrada la BHE tras el ictus. El uso de animales modificados genéticamente, como los ratones deficientes en MMP9, o bien la inhibición farmacológica de MMP9, han demostrado que se produce una protección robusta de la BHE impidiendo el aumento de su permeabilidad. Así mismo los animales deficientes en MMP9 presentan menor volumen de infarto y edema, menor incidencia de TH y menor déficit funcional (Asahi, Asahi, Jung, *et al.*, 2000; Lapchak *et al.*, 2000; Asahi *et al.*, 2001; Fernandez-Patron *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2010). También se ha demostrado que en roedores la expresión de MMP2 no está asociada a la isquemia y que su inhibición no confiere ninguna protección a la ruptura de la BHE (Asahi, Asahi, Jung, *et al.*, 2000; Asahi *et al.*, 2001; Gidday *et al.*, 2005b). Además se ha estudiado la MMP3, ya que esta es un activador de la MMP9 (Ogata, Enghild and Nagase, 1992; Solé *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los animales deficientes en MMP3 presentan niveles reducidos de MMP9 activa, menor número de neutrófilos infiltrantes y menor ruptura de la BHE en comparación con los ratones nativos (Gurney, Estrada and Rosenberg, 2006).

En humanos se ha determinado que la expresión de MMP9 incrementa rápidamente tras el ictus (Anthony *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1997; Rosell *et al.*, 2006; Amaro *et al.*, 2009). Algunos estudios han investigado la expresión de MMP9 en sangre periférica en humanos y han concluido que su aumento se relaciona principalmente con la TH del infarto y con el ictus hemorrágico (Abilleira *et al.*, 2003; Montaner *et al.*, 2003; Rosell *et al.*, 2006). Así mismo, se ha observado que los niveles plasmáticos altos de MMP9 se correlacionan con una lesión más grave y con una peor recuperación funcional (Montaner *et al.*, 2003; Rodriguez-Yanez *et al.*, 2006; Amaro *et al.*, 2009; Inzitari *et al.*, 2013). En humanos hay una correlación entre los niveles iniciales de MMP9, el volumen del infarto y la transformación hemorrágica posterior. Se ha reportado que los pacientes con TH presentaban mayores niveles basales de MMP9 comparados con los que no tenían hemorragia y se sugiere el uso de la MMP9 como predictor de esta consecuencia tras el ictus (Montaner *et al.*, 2003; Castellanos *et al.*, 2007; Florczak-Rzepka *et al.*, 2012). En humanos tras la trombólisis con rtPA se incrementa el riesgo de TH relacionado con los niveles de MMP9 (Inzitari *et al.*, 2013; Turner and Sharp, 2016), ya que el tPA activa directamente esta proteasa, hecho que también se ha demostrado experimentalmente (Lapchak *et al.*, 2000). Además, la presencia de neutrófilos que expresan MMP9 se asocia a la degradación de la lámina basal y a la TH del infarto (Rosell *et al.*, 2008), este efecto puede estar potenciado por el rtPA ya que se ha descrito que este causa un aumento de la degranulación de los neutrófilos y liberación de MMP9 (Cuadrado *et al.*, 2008).

### 3.4 Transformación hemorrágica del infarto

La transformación hemorrágica (TH) es un fenómeno complejo y multifactorial en el cual el tejido cerebral isquémico se convierte a una lesión hemorrágica con fuga de los vasos sanguíneos y extravasación que empeora el daño isquémico. Se ha estimado que alrededor del 40% de los ictus isquémicos sufren una transformación hemorrágica (Wang and Lo, 2003; Jickling *et al.*, 2014) y que esta está asociada al incremento de la morbilidad y la mortalidad del ictus. El mecanismo fundamental que permite la salida de células sanguíneas es la ruptura de la vasculatura que conforma la BHE, y por lo tanto la TH está coligada a la reperfusion. La reperfusion por sí misma puede generar una TH pero cuando se administra tPA, el riesgo de TH aumenta, como se observa en la Fig. 21. Diversos estudios han determinado que la TH y la ruptura de la BHE son más comunes en los pacientes tratados con rtPA que en los pacientes no tratados (Khatri *et al.*, 2012b; Fagan *et al.*, 2013).

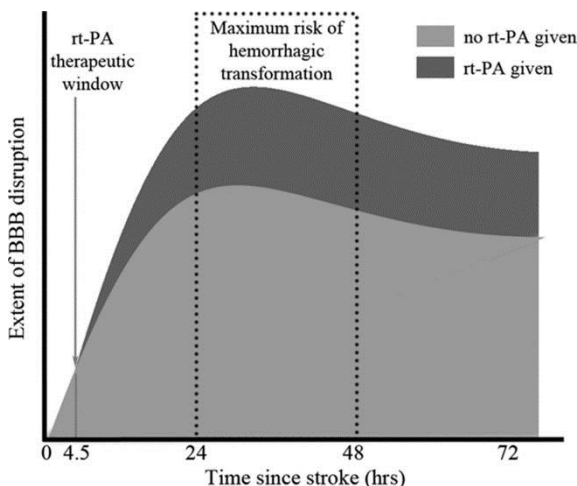


Fig. 21. Ilustración de la evolución de la ruptura de la BHE tras el accidente cerebrovascular. El período de mayor perturbación de la barrera coincide con el máximo riesgo de transformación hemorrágica. El rtPA puede exacerbar la alteración de BHE. Tomado de Kassner & Merali 2015

La gravedad de la TH puede variar desde sangrados microscópicos hasta grandes hemorragias. En los estudios clínicos se suele clasificar en 2 grupos:

- Infarto hemorrágico (HI). Este puede ser causado por una discreta pérdida de la integridad microvascular que permite la extravasación de eritrocitos al parénquima cerebral (Turner and Sharp, 2016). Se presenta como pequeñas petequias o petequias simples HI1; o también como petequias que confluyen en una hemorragia HI2.
- Hemorragia parenquimal (HP), que involucra una ruptura importante de la vasculatura cerebral que permite que se desarrolle un hematoma. Este puede ser pequeño (<30% del infarto) con un efecto de masa medio que se clasificaría como HP1, o grande, clasificado como HP2 que es un hematoma en sí mismo (>30% del infarto) con un gran efecto de masa que se correlaciona con el empeoramiento clínico y mayor mortalidad (del Zoppo, 2010b; Khatri *et al.*, 2012b; Turner and Sharp, 2016).

La TH también se puede clasificar como sintomática o asintomática basándose en el deterioro del estatus neurológico. Generalmente las hemorragias grandes suelen ser sintomáticas, tener un peor pronóstico y un menor índice de recuperación funcional y cognitivo (Jickling *et al.*, 2014)

Desde el punto de vista clínico es difícil estudiar los efectos de la I/R en la TH sin los efectos de la administración de tPA. Para ello se han extrapolado los resultados de los modelos experimentales ya que los animales pueden ser reperfundidos mecánicamente. En ratas se ha observado que la duración de la isquemia es proporcional a la tasa de TH. Por ejemplo, un estudio en ratas SD mostró que en la reperusión tras 5 horas de oclusión, el 81,8% de las ratas presentó TH (Lu *et al.*, 2009). En otro estudio en ratas Wistar se observó que tras 5 horas de tMCAO el 100% de las ratas presentaba TH (Fagan *et al.*, 2003). Resultados similares se han obtenido de diferentes estudios en ratas y ratones, con la conclusión de que la reperusión tardía después de tiempos prolongados de isquemia aumenta el riesgo de TH, empeora la recuperación y aumenta la mortalidad tras la MCAO (Copin and Gasche, 2008; Lu *et al.*, 2008; Garcia-Yebenes *et al.*, 2011). Los estudios en roedores en el modelo de la MCAO con el método del filamento son consistentes con los estudios en ictus en humanos, donde se ha observado que los pacientes tratados con trombectomía mecánica también pueden presentar TH (Copin and Gasche, 2008; San Roman *et al.*, 2012; Fagan *et al.*, 2013; Renú *et al.*, 2017).

En pacientes, el retraso en la reperusión del tejido conlleva un incremento en el riesgo de TH, tanto en los pacientes tratados con tPA como en los no tratados (Copin and Gasche, 2008). La recanalización tardía (>6 horas) es un predictor independiente de TH en el ictus humano, mientras que la reperusión temprana se asocia a un menor riesgo de TH (Molina *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2011). Este es el factor más determinante por el cual la ventana terapéutica del rtPA es tan corta.

La TH es una de las complicaciones más preocupantes en pacientes tratados con tPA, la administración de este hace que el riesgo de TH se incremente de 6 a 10 veces (Lees *et al.*, 2010; Khatri *et al.*, 2012b; Jickling *et al.*, 2014). El tPA promueve la TH por numerosos mecanismos. El simple hecho de que promueva la reperusión y la trombólisis degradando el coágulo ya son factores importantes para la presentación de la TH. Sin embargo el tPA tiene otros efectos en la cascada de la I/R independientes de sus propiedades trombolíticas (Wang *et al.*, 2004). El tPA incrementa la MMP9, MMP2 y MMP3 mediante efectos sobre sus receptores específicos. Por ejemplo, el tPA puede promover la degranulación de los neutrófilos para aumentar la MMP9 (Gasche *et al.*, 2006; Cuadrado *et al.*, 2008), puede actuar sobre la proteína del receptor de la lipoproteína de células endoteliales (LRP) para aumentar la MMP3



y la MMP9, y a través de receptores de PDGFR $\alpha$  de astrocitos aumentar la MMP2 (Jickling *et al.*, 2014).

La degradación/ruptura de la BHE precede a la transformación hemorrágica del infarto en el ictus isquémico. Como ya hemos visto, la BHE se abre en varias fases tras el ictus y esta apertura bifásica está correlacionada con la TH. Jickling postula que hay diferentes mecanismos por los que se puede producir la TH, dependiendo de su tiempo de presentación y esto hace posible que se las pueda clasificar en TH temprana (entre las primeras 18 a 24 horas) y TH tardía (posterior a las 18 a 24 horas) (Jickling *et al.*, 2014). En la Fig. 22 se esquematizan y se explican estos mecanismos.

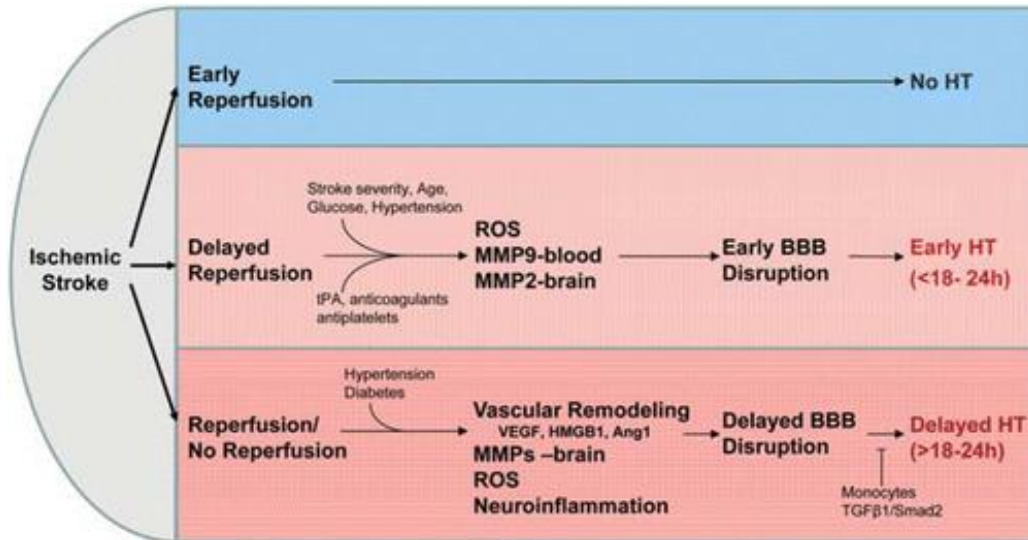


Fig. 22. La reperfusion temprana reduce el riesgo de transformación hemorrágica (TH). La reperfusion tardía aumenta la ruptura de la BHE y el riesgo de TH. Los ROS, la MMP9 derivada de leucocitos y la MMP2 derivada del cerebro, tienen un papel importante en la producción de ruptura temprana de la BHE y TH temprana. Por el contrario, las remodelaciones vasculares derivadas del cerebro, las MMP (MMP9, MMP2 y MMP3), otras proteasas cerebrales (plasmina, tPA endógena, uPA y catepsinas), los ROS y la neuroinflamación, contribuyen a la ruptura de la BHE y TH tardía. Un subconjunto de monocitos que entran en el cerebro puede prevenir la TH retardada. Tomado de (Jickling *et al.* 2014).

Los ROS y las MMPs son las moléculas más implicadas en la ruptura de la BHE y la TH del infarto. En estudios animales en que se han inhibido los ROS se ha visto una reducción de la tasa de TH (Asahi, Asahi, Wang, *et al.*, 2000; Lapchak *et al.*, 2002). Sin embargo, en humanos la inhibición de los ROS no ha demostrado una menor prevalencia en la TH, ni tampoco mejoría en la recuperación funcional (Lees *et al.* 2006; Shuaib *et al.* 2007).

Diversos procesos secundarios de daño parenquimal y muerte celular prosiguen a la TH del infarto. Los eritrocitos extravasados, las proteínas del plasma y los detritos celulares causan más daño al tejido isquémico ya deteriorado (Florczak-Rzepka *et al.*, 2012). La sangre extravasada que infringe un efecto de masa, produce un daño mecánico causado por la presión hemodinámica del hematoma y del edema, que presiona persistentemente el tejido adyacente aumentando la presión intracraneal (Wang and Lo, 2003). Además, esta presión puede aumentar la zona isquémica al evitar la restauración del FSC en zonas adyacentes por la compresión y puede activar la excitotoxicidad y la apoptosis. La sangre tiene múltiples factores tóxicos que entran al parénquima cerebral tras la TH. Por ejemplo: el glutamato que está en la sangre en una concentración 10 veces mayor que en el compartimento extracelular cerebral amplifica el daño por excitotoxicidad (Matsumoto *et al.*, 1996). La trombina es un factor proapoptótico, que tras la TH se libera localmente en el cerebro, al igual que el TNF $\alpha$  (Wang and Lo, 2003). Al mismo tiempo los eritrocitos, que son lisados alrededor de las 24 horas,

liberan hemoglobina y hierro que generan radicales libres produciendo daño celular por estrés oxidativo (Florczak-Rzepka *et al.*, 2012), además son neurotóxicos ya que pueden inducir apoptosis (Wang and Lo, 2003). En general, el edema, la presión y la toxicidad causados por la ruptura de la BHE y la TH pueden causar la muerte neuronal masiva.

Es importante recalcar que en la clínica los pacientes que sufren un ictus suelen tener enfermedades concomitantes que pueden afectar el estado fisiológico de los vasos sanguíneos y de la presión arterial, y que los modelos animales que usamos no reflejan todos los estadios de la patología observados en humanos. Por lo tanto, la investigación experimental de la TH requiere el uso de unas pautas o recomendaciones, como los modelos animales, el uso de controles, la categorización, el uso de diversas técnicas y los tiempos de evaluación de la TH, y también la mortalidad para poder trasladar los resultados experimentales a la clínica (Fagan *et al.*, 2013). La prevención de la transformación hemorrágica tras la reperusión con rtPA o sin él, es un objetivo importante en el tratamiento del ictus isquémico. Diversos trabajos centran sus estudios en este tema. Por ejemplo, un estudio en modelos murinos postula que cierta población de monocitos/macrófagos puede prevenir la TH (Gliem *et al.*, 2012), como también la terapia con oxígeno puede disminuir la frecuencia de la TH en ratas (Sun *et al.*, 2010), así mismo el uso de medicamentos como el Fingolimod en ratones (Campos *et al.*, 2013) y en pacientes con ictus (Zhu *et al.*, 2015a), que trataremos en el apartado 4.2, parecen prevenir la TH.

#### 4. NEUROPROTECCIÓN

El único tratamiento del ictus es la reperusión, ya sea por trombólisis farmacológica o por trombectomía mecánica. La principal meta de este tratamiento es salvar el tejido que continúa siendo viable en la penumbra isquémica, proporcionando flujo sanguíneo al tejido hipoperfundido, sin embargo, la reperusión no siempre es eficaz y además puede ser dañina para el tejido.

La definición de neuroprotección hace referencia al efecto de cualquier sustancia química o biológica que puede prevenir, mitigar o retrasar la muerte celular del tejido cerebral. Desde el punto de vista científico se refiere al hecho de minimizar los efectos nocivos de la isquemia a nivel de las neuronas, sin embargo para los pacientes y los médicos, la neuroprotección significa mantener el daño neuronal y glial bajo el umbral de la manifestación de los síntomas (Chamorro *et al.*, 2016).

En concreto, la finalidad de la neuroprotección en el ictus, es el balance de las respuestas del organismo ante un evento isquémico del tejido cerebral para proteger la UNV y rescatar el tejido salvable (Fig. 23). Los mecanismos fisiopatológicos que se activan tras la isquemia/reperusión y sus interacciones son extremadamente complejos y pueden actuar como una espada de doble filo, ya que pueden tener efectos beneficiosos o dañinos. Ninguno de estos mecanismos es completamente malo o bueno, se debe determinar en qué contexto, momento y estímulo, una misma molécula, célula o vía de señalización, puede tomar parte en la destrucción o en la reparación del tejido (Endres *et al.*, 2008).

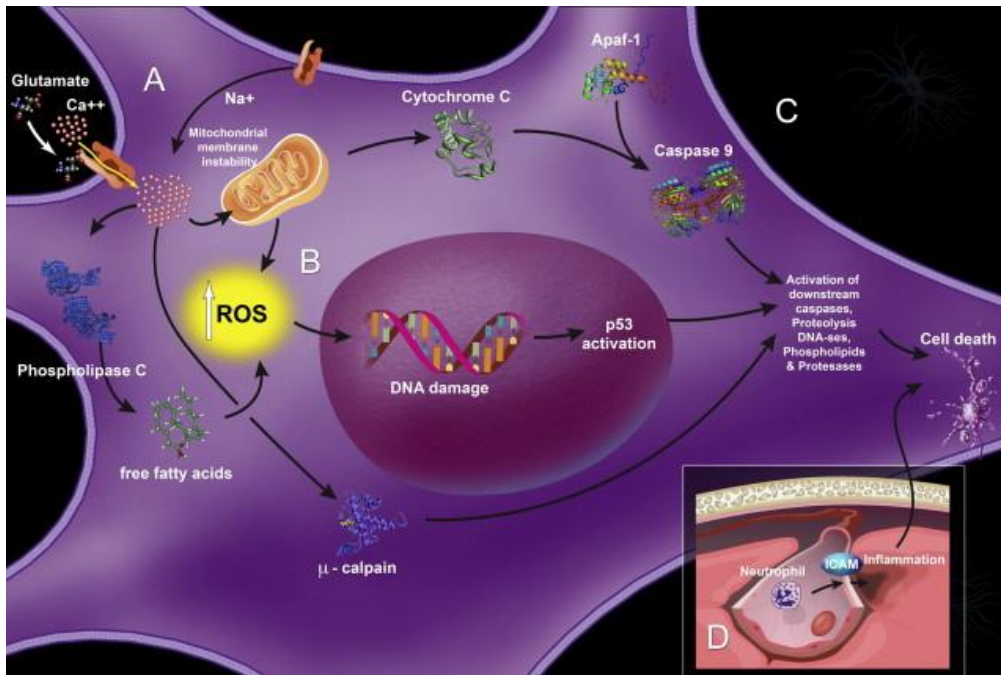


Fig. 23. Ilustración de las cascadas de señalización celular y mecanismos de isquemia objetivos de algunos agentes neuroprotectores. En la excitotoxicidad (A), se han usado los bloqueadores de los canales de sodio y potasio. Para la producción de ROS (B), que puede conducir al daño del ADN y a la muerte celular, se ha probado la administración de antioxidantes. La administración de agentes neurotróficos y vasoactivos puede modificar la matriz extracelular (C) y han mostrado ser prometedores en el ictus experimental. Finalmente, para los leucocitos que agravan el daño isquémico (D), se han diseñado anticuerpos para dirigir los receptores de superficie celular y células endoteliales con el fin de prevenir la infiltración de estas células en el lecho isquémico y evitar el daño oxidativo. Modificado de (Grupke et al., 2015)

Durante décadas de investigación experimental se han postulado diversos agentes neuroprotectores con resultados prometedores en el tratamiento del ictus, sin embargo en los ensayos clínicos, estos mismos agentes han fallado y no han mostrado los beneficios esperados. Los modelos animales no reflejan todas las características ni la complejidad del tiempo en el tratamiento de la patología humana, por esta razón es indispensable continuar investigando sobre la neuroprotección, con el fin de minimizar los daños desencadenados por la cascada de la I/R y también para incrementar la eficacia y aplicabilidad de la trombólisis o la trombectomía, ya que la reperfusión y la neuroprotección deben ir de la mano para revolucionar el tratamiento del ictus isquémico agudo.

#### 4.1 Antioxidantes

Se ha propuesto que la clave para que los agentes neuroprotectores puedan ser efectivos clínicamente, reside en la capacidad del compuesto para inhibir múltiples vías de la cascada isquémica o de procesos fisiológicos, simultánea o secuencialmente (Lapchak, 2010), como los antioxidantes. Estos pueden tener diferentes formas de acción, pueden ser inhibidores de la producción, neutralizadores o barredores de radicales libres, o incluso pueden ser potenciadores de su degradación.

Los radicales libres son una diana terapéutica importante para la neuroprotección, ya que el estrés oxidativo es un componente muy significativo de la cascada isquémica (Lapchak, 2010) y porque el cerebro es muy susceptible a este tipo de daño. El peroxinitrito es el radical libre en el que se han enfocado muchos estudios de neuroprotección, ya que este no ha

demostrado tener función fisiológica (Chamorro *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la prevención de los efectos del estrés oxidativo por medio de antioxidantes es una medida efectiva capaz de limitar la expansión de la lesión isquémica en modelos animales (Fabian, DeWitt and Kent, 1995; Romanos *et al.*, 2007; Pérez-Asensio *et al.*, 2010). A lo largo de las últimas tres décadas se han postulado muchos fármacos antioxidantes que funcionan en los modelos animales, sin embargo, casi todos han fracasado en el intento de trasladar sus resultados a la clínica.

El NYX-059 es una nitrona captadora de ROS que demostró un efecto neuroprotector sustancial en los modelos animales de isquemia cerebral (Macleod *et al.*, 2008). Se ha propuesto como un barredor de radicales libres, pero se desconoce su lugar de acción. No existe una clara evidencia de si tiene la capacidad de cruzar la BHE o si actúa sobre la vasculatura cerebral. El primer ensayo clínico del NYX-059 (SAINT I) demostró tener un beneficio pequeño pero significativo en el primer punto final (Lees *et al.* 2006), pero este beneficio no fue observado en el estudio subsecuente (SAINT II) más completo (Shuaib *et al.* 2007).

El Edaravone, es un barredor de radicales libres. Las investigaciones iniciales *in vitro* han demostrado la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y el daño endotelial (Watanabe *et al.*, 1988). *In vivo* se ha observado que previene el daño a la BHE, así como el edema y la muerte neuronal, reduciendo las secuelas neurológicas (Nishi *et al.*, 1989; Kawai *et al.*, 1997). Estudios más recientes muestran que el Edaravone incrementa el FSC y reduce el edema (Jin *et al.*, 2002; Nito *et al.*, 2003), y en otros se ha observado que puede reducir el volumen del infarto (Watanabe *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2000). Además se demostró que puede ser usado con el rtPA, aumentando la ventana terapéutica de este y reduciendo el riesgo de TH (Lapchak, 2010; Kikuchi *et al.*, 2013). El Edaravone se aprobó para el uso clínico en Japón desde 2001 en pacientes con ictus isquémico. Se han realizado estudios clínicos para determinar la ventana terapéutica óptima (Unno, Katayama and Shimizu, 2010) y su seguridad y farmacocinética (Kaste *et al.*, 2013). Sin embargo una revisión sistemática de 8 ensayos clínicos con Edaravone reportan que no hay una evidencia de la eficacia de este fármaco en pacientes con ictus isquémico agudo, aunque algunos pacientes pueden beneficiarse de los efectos de este antioxidante (Feng *et al.*, 2011).

Otras moléculas como el ebselen o la citicolina no han mostrado eficacia al ser trasladadas del laboratorio a la clínica. Inclusive se han estudiado moléculas como el mesilato de tirilazad que demostró no ser efectivo como neuroprotector y además reveló tener un efecto negativo en los pacientes con ictus isquémico agudo (TISC, 2000; Grupke *et al.*, 2015).

### 4.1.1 Ácido úrico

El ácido úrico (AU) se considera tradicionalmente un producto final metabólicamente inerte del metabolismo de la purina en el ser humano. La enzima xantina oxidoreductasa cataliza la formación del AU a partir de la xantina y la hipoxantina. Este compuesto omnipresente, o más correctamente su monoanión urato, ha demostrado ser un antioxidante selectivo, especialmente capaz de reaccionar con radicales hidroxilo y ácido hipocloroso, convirtiéndose a sí mismo en productos inocuos (alantoína, alantoato, glioxilato, urea y oxalato) (Becker, 1993). El AU puede servir como marcador de estrés oxidativo y puede tener un rol terapéutico como antioxidante (Glantzounis *et al.*, 2005).

Actualmente se dispone de una amplia evidencia de la capacidad protectora del AU sobre el tejido isquémico. El AU representa hasta dos tercios de la capacidad antioxidante total del

plasma (Chamorro *et al.*, 2016). Actúa como potente inhibidor de la peroxidación lipídica y es un eficaz neutralizador de ROS y RNS (Becker, 1993), además es un quelante de metales de transición e inhibe la reacción de Fenton, previene la degradación de la SOD y neutraliza los radicales generados por la descomposición del peroxinitrito (Squadrito *et al.*, 2000; Llull *et al.*, 2015). *In vitro*, el AU ha demostrado que puede prevenir la muerte celular inducida por el glutamato (Yu *et al.*, 1998).

La administración de AU exógeno ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos animales de isquemia permanente y transitoria, reduciendo el volumen de infarto y mejorando el resultado funcional (Yu *et al.* 1998; Squadrito *et al.* 2000; Onetti *et al.* 2015), tanto de forma aislada como en combinación con el rtPA, sugiriendo efectos sinérgicos con el tratamiento trombolítico (Romanos *et al.*, 2007). Aunque el AU no cruza la BHE, se ha demostrado que la administración de AU disminuye el volumen de infarto en ratas que presentan hiperemia postisquémica y mejora la recuperación funcional de estas (Onetti *et al.*, 2015). Este estudio propone que el ácido úrico puede atenuar el daño vascular posreperusión ya que aumenta la luz vascular, disminuye la nitrosilación de proteínas de la vasculatura y el parénquima cerebral, también disminuye los niveles de IL18 circulantes y reduce la infiltración de macrófagos. Es decir que el AU puede bloquear la producción de radicales libres desde la pared del vaso y realizar funciones neuroprotectoras sin necesidad de ingresar al parénquima cerebral, lo que lo convierte en una interesante posibilidad terapéutica que necesita mayor investigación para determinar las vías de acción de este prometedor agente.

Diversos estudios clínicos iniciales han demostrado que la administración del AU puede tener un efecto neuroprotector. En un estudio piloto se demostró que el AU puede ser seguro en combinación con el tratamiento trombolítico, además disminuye la peroxidación lipídica y previene una caída temprana de AU endógeno en suero en pacientes tratados con rtPA en las 3 primeras horas del ictus (Amaro *et al.*, 2007). Otro estudio demostró que la cantidad de MMP9 activa en plasma de pacientes isquémicos disminuía tras el tratamiento con AU (Amaro *et al.*, 2009). Un estudio más reciente demostró que un alto nivel de ácido úrico endógeno en el inicio de la patología es un biomarcador de mejor pronóstico en pacientes con ictus isquémico, y que este tiene un efecto protector sobre el resultado neurológico después del accidente cerebrovascular isquémico agudo (Z. Wang *et al.*, 2016).

La evidencia preclínica y los datos clínicos disponibles impulsaron el desarrollo del ensayo clínico URICO-ICTUS. Este ensayo en la fase 2b/3 ha confirmado que el tratamiento en combinación del AU con el rtPA es seguro dentro de las primeras 4,5 horas del inicio de los síntomas, en pacientes con ictus isquémico (Chamorro *et al.*, 2014). Aunque en este estudio no se ha podido demostrar la eficacia de la administración de AU en el primer punto de evaluación (mRs a 90 días tras el episodio isquémico), si se observó que el AU redujo la incidencia del deterioro clínico temprano y que mayor cantidad de pacientes tratados obtuvieron una independencia completa y un pronóstico excelente en comparación con los pacientes del grupo placebo, a los 90 días (Chamorro *et al.*, 2016). En evaluaciones posteriores con subgrupos predefinidos de pacientes del ensayo URICO-ICTUS, se demostró que la administración de AU reducía el volumen de infarto y mejoraba el resultado funcional en pacientes que presentaban hiperglucemia, en aquellos que tenían una recanalización temprana y en mujeres (Amaro *et al.*, 2015; Llull *et al.*, 2015). Actualmente se están realizando ECAs de tratamiento con AU en seres humanos, pero se requiere más investigación en modelos preclínicos que incluyan el uso de machos y hembras, como el uso de animales que presenten comorbilidades, para explorar las vías de acción y la eficacia del tratamiento, y posiblemente su extrapolación a la clínica.



### 4.2 Inmunomoduladores

La respuesta inflamatoria inmunomediada que sucede tras el evento isquémico es actualmente un potencial objetivo terapéutico para la neuroprotección. Los mediadores inflamatorios y las células inmunes que migran al cerebro tras el ictus causan la ruptura de la BHE e incrementan el daño por reperusión. La inmunomodulación es un objetivo muy deseado pero difícil de alcanzar, ya que los leucocitos cumplen diversas funciones, tanto beneficiosas como dañinas, en los diferentes estadios del ictus. El objetivo de la inmunomodulación trasladado a los ensayos clínicos está enfocado a la fase temprana de la inflamación, aún así, en los pacientes con ictus isquémico la modulación del sistema inmunitario puede exacerbar la inmunodepresión postisquémica y aumentar la posibilidad de complicaciones infecciosas (Veltkamp and Gill, 2016).

Con base en los diferentes estudios experimentales con inmunomoduladores se han desarrollado algunos ensayos clínicos que tienen como objetivo diferentes componentes del sistema inmune. Uno de ellos es la inhibición de la IL1 $\beta$  por medio de su receptor IL1Ra. La administración del antagonista IL1Ra se asocia a una reducción del volumen de infarto de un 38,2% en modelos animales estudiados en un metaanálisis de 16 publicaciones preclínicas (Banwell, Sena and Macleod, 2009). Un ensayo clínico se realizó inyectando vía intravenosa el antagonista recombinante humano (rh) IL1Ra tras el ictus, demostrando un posible efecto protector y una mejoría clínica 90 días después del episodio isquémico (Emsley *et al.*, 2005). Sin embargo la administración intravenosa se ha descontinuado y recientemente se ha desarrollado un ensayo clínico fase II con la administración subcutánea de este mismo agonista (Smith *et al.*, 2015; Veltkamp and Gill, 2016), que lamentablemente no ha dado resultados positivos (Smith *et al.*, 2018).

Otro objetivo potencial que ha sido extensamente estudiado es la inhibición de las moléculas de adhesión celular. Por ejemplo el Hu23F2G, es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la integrina  $\beta$ 2 (CD18) del neutrófilo, que ha demostrado no tener ningún efecto en los ensayos clínicos (Del Zoppo, 2010; Smith *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el Enlimomab, un anticuerpo murino monoclonal contra la ICAM1 que demostró protección y mejoría neurológica en ratas (Zhang *et al.*, 1994), pero en los ensayos clínicos se observó que los pacientes evaluados a los 90 días tras el ictus tenían una peor recuperación neurológica e inclusive un mayor número de pacientes tratados morían (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001b), además también tenían reacciones adversas, que posteriormente se asociaron al rechazo del anticuerpo murino por el sistema inmune de los pacientes (Furuya *et al.*, 2001). Así mismo, se ha estudiado el Natalizumab, este es un anticuerpo que bloquea la integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 de los leucocitos, que se ha discutido en el capítulo anterior. En el ensayo preclínico multicéntrico, aleatorizado y ciego a nivel europeo, el Natalizumab ha demostrado reducir el volumen de infarto en modelos animales con infartos pequeños (Llovera, Hofmann, Roth, Salas-Perdomo, Ferrer-Ferrer, Perego, E. R. Zanier, *et al.*, 2015) (Anexo A). Un estudio clínico fase IIa demostró que el Natalizumab no tenía efecto sobre el crecimiento del infarto en los primeros 5 días tras el ictus, pero sí se observó una excelente mejoría funcional a los 30 y 90 días en los pacientes tratados, sobre todo en aquellos con infartos pequeños o en los que tenían una mayor exposición al tratamiento (Elkins *et al.*, 2017b). A mediados de 2016 se inició el estudio fase IIb con el Natalizumab (Biogen 2016), recientemente la empresa emitió un comunicado explicando que el ensayo había resultado ser negativo (Pharmaphorum 2018).

4.2.1 Fingolimod

El Fingolimod (FTY720) es una molécula con propiedades inmunoterapéuticas que tiene como objetivo los receptores de la esfingosina-1-fosfato (S1P). La S1P es un mensajero primario intercelular, que al interactuar con sus 5 receptores (S1P<sub>1-5</sub>) tiene una gran variedad de funciones fisiológicas. La S1P regula la respuesta y la función de varios sistemas celulares y órganos, como la diferenciación, migración y proliferación celular, también regula la respuesta inmune, el tráfico de linfocitos B y T, y la estabilidad vascular (Gardell, Dubin and Chun, 2006; Huwiler and Pfeilschifter, 2008). Los receptores S1P exhiben patrones de expresión superpuestos o distintos en varias células y tejidos, y como resultado, las diversas funciones celulares de S1P se han asignado a subtipos de receptores S1P (Park and Im, 2017). El mecanismo responsable de la actividad inmunosupresora del Fingolimod se debe a la regulación del tráfico de linfocitos T a través de su receptor S1P.

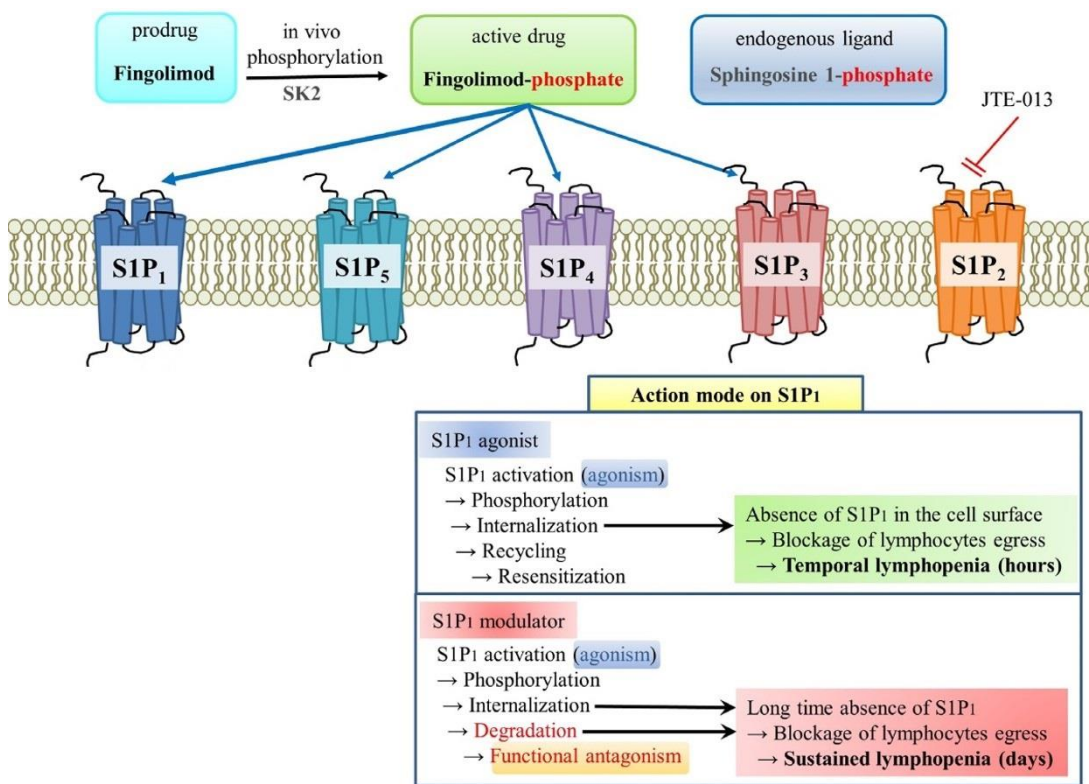


Fig. 24. Mecanismo de acción del Fingolimod. El Fingolimod se transforma en Fingolimod-fosfato por la esfingosina quinasa (SK). El Fingolimod-fosfato puede activar S1P1, S1P3, S1P4 y S1P5. La activación de S1P1 en linfocitos conduce a su internalización. Esta internalización expone S1P1 a la degradación proteosomal, que impide el reciclado de S1P1 y esto conduce a la pérdida de S1P1 de la membrana plasmática. Esta ausencia de S1P1 bloquea la egresión de linfocitos de órganos linfoides secundarios y reduce los recuentos de células T y B en la sangre. Se presume que la linfopenia es el principal mecanismo por el cual el Fingolimod causa supresión inmune. Esquema modificado de Park & Im 2017

El Fingolimod es un producto que se fabrica a partir de la miriocina, un elemento natural inmunosupresivo. El Fingolimod es una prodroga, ya que tras su administración es fosforilada por la esfingosina quinasa (SK1 y SK2) y una vez fosforilado actúa sobre 4 de los 5 receptores de S1P (S1P1, S1P3, S1P4 y S1P5). Además el Fingolimod actúa sobre la S1P1 de forma agonista y antagonista (Park and Im, 2017), como se observa detalladamente en la Fig. 24. El Fingolimod a través del receptor S1P1 altera el tráfico de las células T CD4+ nativas y activadas por antígeno, controla la salida de los linfocitos desde los tejidos linfoides secundarios y la función de la barrera endotelial (Chiba, 2005; Brinkmann, 2007). El Fingolimod actúa sobre S1P1

produciendo la internalización de este receptor en el linfocito causando con la ausencia de este receptor en la superficie de la célula un bloqueo de la circulación desde los órganos linfoides.

El Fingolimod fue aprobado en el 2010 para el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente y ha demostrado que reduce la tasa de pérdida de volumen del cerebro en pacientes con esta enfermedad (De Stefano, Silva and Barnett, 2017). El Fingolimod al ser lipofílico puede cruzar la BHE y alcanzar altas concentraciones en el SNC, donde los receptores de S1P son abundantes. Pueden ser expresados por la microglía (S1P1, S1P2, S1P3 y S1P5), los astrocitos (S1P1, S1P2 y S1P3), los oligodendrocitos (S1P1, S1P3 y S1P5), las neuronas (S1P1 y S1P3), las células progenitoras neuronales (Groves, Kihara and Chun, 2013) y las células endoteliales de la BHE (Hunter, Bowen and Reder, 2016). Diversos estudios preclínicos demuestran claramente los efectos del Fingolimod en las células del cerebro y al parecer el Fingolimod en el SNC tiene efectos independientes al secuestro de linfocitos (Fig. 25). Se le otorgan propiedades como una molécula neuroprotectora y remielinizante (Ayzenberg, Hoepner and Kleiter, 2016). El Fingolimod puede inducir la proliferación de las células progenitoras neuronales (Harada *et al.*, 2004), incrementar la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (Deogracias *et al.*, 2012; Doi *et al.*, 2013), y prevenir la apoptosis inducida por la privación de glucosa (Coelho *et al.*, 2007; Miron *et al.*, 2008). Además datos experimentales indican que el Fingolimod puede reducir la actividad inflamatoria de la microglía (Noda *et al.*, 2013; Kolahdooz *et al.*, 2015) y la producción de NO del astrocito, sugiriendo que el fármaco actuando por su vía inmunomoduladora y por vías independientes de la inmune, podría reducir la neurodegeneración mediada por los astrocitos (Colombo *et al.*, 2014). Sumado a esto, al Fingolimod se le atribuyen efectos protectores sobre la vasculatura cerebral (Hunter, Bowen and Reder, 2016) y se ha demostrado que actúa sobre las células endoteliales disminuyendo la permeabilidad de la BHE y promoviendo el ensamblaje de las uniones adherentes a través de receptores S1P1 (Brinkmann, 2007).

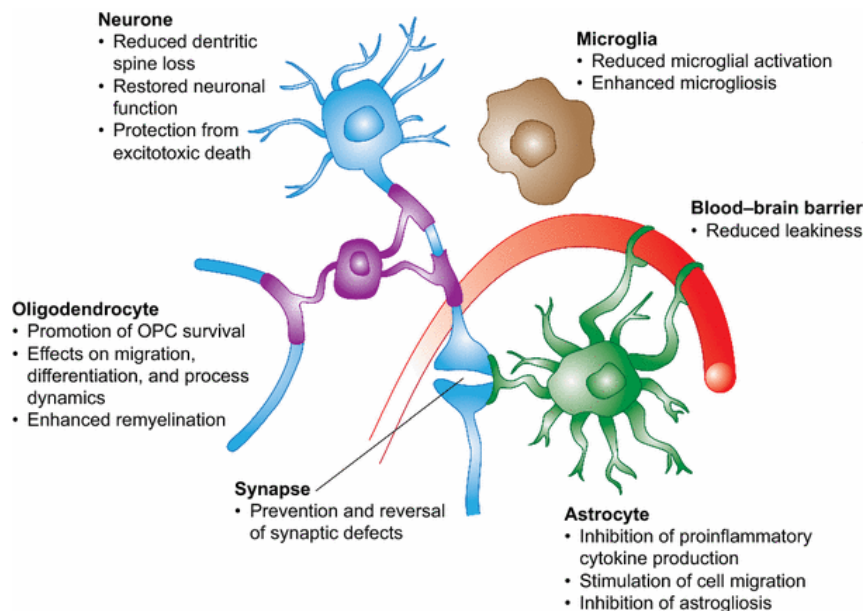


Fig. 25. Resumen de los efectos del tratamiento con Fingolimod en diferentes células del sistema nervioso central. OPC: Célula precursora de oligodendrocitos. Tomado de Groves et al. 2013

Por estas razones, el Fingolimod ha sido probado en diversas patologías en las que los mecanismos autoinmunes desempeñan un papel sustancial o en las que las potenciales propiedades neuroprotectoras podrían ser favorables. El Fingolimod también ha sido probado



para tratar el daño por I/R de diversos órganos. Por ejemplo, un estudio en animales con isquemia renal demostró que el Fingolimod inhibe significativamente la infiltración leucocitaria y la permeabilidad vascular (Awad *et al.*, 2006). Otros estudios han demostrado que el Fingolimod atenúa la presión arterial y mejora la función orgánica tras la I/R de corazón y pulmón (Hofmann *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2015). En modelos animales de isquemia cerebral el Fingolimod ha sido muy estudiado. Un metaanálisis del año 2013 de los artículos de investigación preclínica, demuestra que el Fingolimod es efectivo reduciendo el volumen de infarto y mejorando el resultado funcional de los animales con ictus isquémico agudo en modelos de MCAO transitoria, pero no tiene efecto en los animales con isquemia permanente (Liu *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio también hemos observado que el Fingolimod y en particular los agonistas selectivos de S1P1, pueden reducir el volumen de infarto en ratones en el modelo de oclusión transitoria (Brait *et al.*, 2016). Así mismo, también se ha demostrado que el Fingolimod reduce la TH del infarto asociado a la administración de tPA, y que la asociación entre el trombolítico y el Fingolimod es segura (Campos *et al.*, 2013). Además, un estudio demuestra que el efecto protector del Fingolimod tras el ictus se debe al posible mantenimiento de la permeabilidad microvascular y no solo a efectos sobre el tejido cerebral. Por otra parte, se ha observado que el Fingolimod tiene resultados protectores en modelos de hemorragia intracerebral en ratones (Rolland *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014) y un estudio clínico piloto de ictus hemorrágico mostró que el Fingolimod protegía la permeabilidad vascular (Li *et al.*, 2015).

Otros estudios clínicos piloto se han desarrollado en pacientes con ictus isquémico agudo. En el primero, los pacientes habían excedido la ventana terapéutica del trombolítico y se les administró Fingolimod por vía oral, lo que permitió observar que este era seguro, disminuía el daño secundario al tejido y la permeabilidad microvascular, los déficits neurológicos se atenuaban y promovía la recuperación funcional (Fu *et al.*, 2014). En otro estudio se observó que la terapia de Fingolimod y rtPA fue bien tolerada, que había menor daño por reperfusión, ya que los pacientes tratados presentaban menor volumen de infarto, menor tasa de TH y menor puntuación de déficit neurológico, además había una mayor recuperación funcional al día 90 tras el episodio isquémico agudo en los pacientes que recibieron el Fingolimod (Zhu *et al.*, 2015b). Actualmente se está realizando un estudio clínico fase II con Fingolimod en pacientes con ictus agudo (Park and Im, 2017).

En conjunto, los datos clínicos y de laboratorio actuales sugieren un papel beneficioso del Fingolimod en la prevención de la progresión de la lesión isquémica. El Fingolimod promueve la rehabilitación a corto y largo plazo, tanto en el tratamiento con o sin tPA, como en la hemorragia intracraneal. Aunque el mecanismo exacto todavía no está dilucidado, es posible deducir, que estos resultados al menos en parte se deben al secuestro periférico de linfocitos, no obstante hay evidencia de otras formas de inmunomodulación, ya sea a través de la disminución de los astrocitos reactivos, la vasoprotección (tanto inmunológica como directa) o la neuroprotección directa a través de los receptores S1P superficiales e intracelulares (Li, Xu and Testai, 2016), de los diversos tipos celulares de la UNV.



## *OBJETIVOS*



En los últimos años se han producido avances importantes en el tratamiento del ictus isquémico agudo mediante las terapias de reperfusión que incluyen el tratamiento trombolítico con tPA y la trombectomía mecánica. Los tratamientos endovasculares están experimentando un auge creciente tras la reciente demostración de su eficacia. Sin embargo, los tratamientos de reperfusión no están exentos de complicaciones y efectos negativos que se conocen como daño por reperfusión. La lesión por reperfusión se conoce bien en el infarto de miocardio, pero su papel en el ictus es más controvertido debido a los enormes efectos beneficiosos de la reperfusión en el cerebro. Aún así, está claro que los tratamientos de reperfusión no funcionan tan bien como sería deseable porque no siempre se consigue un nivel óptimo de reperfusión y porque en determinados casos se producen complicaciones que pueden ser graves, como la TH sintomática. Por tanto, una meta importante en el tratamiento del ictus isquémico agudo es mejorar la reperfusión. En esta tesis hemos abordado diferentes aspectos del daño por reperfusión y su posible tratamiento en modelos experimentales a través de los siguientes objetivos:

- 1) Identificar la contribución del estrés oxidativo en la lesión por isquemia/reperfusión cerebral, utilizando un modelo de ratón hiperglicémico, y evaluar el potencial efecto protector del ácido úrico que es un potente antioxidante natural.
- 2) Estudiar los mecanismos implicados en la TH del ictus isquémico en un modelo experimental de isquemia/reperfusión en ratón, centrándonos en el papel de los linfocitos circulantes.
- 3) Dilucidar si el efecto protector del fármaco inmunomodulador Fingolimod frente a la TH del ictus isquémico está mediado por su acción sobre los linfocitos y evaluar si el Fingolimod puede prevenir la TH en condiciones de trombocitopenia.



## *ARTÍCULOS*





## ARTÍCULO Nº1

**Uric Acid Is Protective After Cerebral Ischemia/Reperfusion in Hyperglycemic Mice**

Carles Justicia, Angélica Salas-Perdomo, Isabel Pérez-de-Puig, Lisette H. Deddens, Geralda A.F. van Tilborg, Clara Castellví, Rick M. Dijkhuizen, Ángel Chamorro y Anna M. Planas

Transl Stroke Res. 2017 Jun;8(3):294-305. doi: 10.1007/s12975-016-0515-1. Epub 2016 Dec 15.

En este trabajo se han estudiado los efectos de la hiperglucemia en ratones tras la inducción del ictus por medio de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media y además se valoran los posibles efectos antioxidantes del ácido úrico mediante la evaluación del volumen del infarto, la expresión de la molécula de adhesión intercelular y la infiltración de neutrófilos al parénquima cerebral.

**Resumen:**

Es común que tras el ictus se observe un aumento de glucosa en sangre. La hiperglucemia se asocia con malos resultados clínicos a largo plazo en numerosos estudios. Esta induce acidosis intracelular, peroxidación de lípidos y producción de peroxinitrito, resultando en la generación de estrés oxidativo y nitrosativo en el tejido isquémico.

En este estudio, se evalúan los efectos de la hiperglucemia aguda *in vivo* por medio de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), el reclutamiento de neutrófilos y el daño cerebral ocasionado después de la isquemia/reperusión en ratones. Además se prueba si el ácido úrico, un antioxidante natural, puede tener efectos protectores sobre el tejido isquémico.

La hiperglucemia se indujo por medio de la administración intraperitoneal de dextrosa 45 minutos antes de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media. Tras 1 hora de oclusión se permitió la reperusión del flujo sanguíneo cerebral. Para evaluar el volumen de la lesión, se realizó resonancia magnética (MRI) a las 24 horas tras la oclusión. Un grupo de ratones normoglucémicos e hiperglucémicos recibió por vía intravenosa una inyección con partículas micrométricas de óxido de hierro (MPIOs), conjugadas con anticuerpo anti-ICAM-1 o anticuerpo control IgG. Posteriormente se realizó una MRI T2\*w. Un grupo de ratones hiperglucémicos recibió una infusión intravenosa de ácido úrico (16 mg/kg) o el vehículo, 45 minutos después de la reperusión. La infiltración de neutrófilos se evaluó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.

Los animales hiperglucémicos que recibieron MPIOs contra la ICAM-1 mostraban en la MRI zonas de contraste significativamente mayores en el hemisferio isquémico, además los ratones hiperglucémicos también mostraron más neutrófilos infiltrantes y lesiones más grandes que los ratones normoglucémicos. El ácido úrico redujo el volumen del infarto en los ratones hiperglucémicos, pero no impidió la expresión de la ICAM-1 vascular y tampoco redujo significativamente el número de neutrófilos infiltrantes en el tejido cerebral isquémico.

En conclusión, la hiperglucemia acrecienta la expresión de la ICAM-1 vascular inducida por la isquemia, aumenta la infiltración de neutrófilos y exacerba la lesión cerebral. El ácido úrico reduce el tamaño de la lesión después de la isquemia/reperusión en ratones con hiperglucemia.





## Uric Acid Is Protective After Cerebral Ischemia/Reperfusion in Hyperglycemic Mice

Carles Justicia<sup>1,2</sup> · Angélica Salas-Perdomo<sup>1,2</sup> · Isabel Pérez-de-Puig<sup>1,2</sup> · Lisette H. Deddens<sup>3</sup> · Geralda A.F. van Tilborg<sup>3</sup> · Clara Castellví<sup>1</sup> · Rick M. Dijkhuizen<sup>3</sup> · Ángel Chamorro<sup>2,4</sup> · Anna M. Planas<sup>1,2</sup>

Received: 28 October 2016 / Revised: 3 December 2016 / Accepted: 6 December 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Hyperglycemia at stroke onset is associated with poor long-term clinical outcome in numerous studies. Hyperglycemia induces intracellular acidosis, lipid peroxidation, and peroxynitrite production resulting in the generation of oxidative and nitrosative stress in the ischemic tissue. Here, we studied the effects of acute hyperglycemia on in vivo intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression, neutrophil recruitment, and brain damage after ischemia/reperfusion in mice and tested whether the natural antioxidant uric acid was protective. Hyperglycemia was induced by i.p. administration of dextrose 45 min before transient occlusion of the middle cerebral artery. Magnetic resonance imaging (MRI) was performed at 24 h to measure lesion volume. A group of normoglycemic and hyperglycemic mice received an i.v. injection of micron-sized particles of iron oxide (MPIOs), conjugated with either anti-ICAM-1 antibody or control IgG, followed by T2\*w MRI. Neutrophil infiltration was studied by immunofluorescence and flow cytometry. A group of

hyperglycemic mice received an i.v. infusion of uric acid (16 mg/kg) or the vehicle starting after 45 min of reperfusion. ICAM-1-targeted MPIOs induced significantly larger MRI contrast-enhancing effects in the ischemic brain of hyperglycemic mice, which also showed more infiltrating neutrophils and larger lesions than normoglycemic mice. Uric acid reduced infarct volume in hyperglycemic mice but it did not prevent vascular ICAM-1 upregulation and did not significantly reduce the number of neutrophils in the ischemic brain tissue. In conclusion, hyperglycemia enhances stroke-induced vascular ICAM-1 and neutrophil infiltration and exacerbates the brain lesion. Uric acid reduces the lesion size after ischemia/reperfusion in hyperglycemic mice.

**Keywords** Stroke · Glucose · ICAM-1 neutrophils · Uric acid

### Introduction

Hyperglycemia occurs in 30–40% of patients with acute ischemic stroke, including patients without known diabetes, and it is associated with a poorer functional outcome [1–3]. Although the benefit of lowering blood glucose has not been demonstrated in clinical trials, evidence-based treatment protocols recommend glucose control in patients with acute stroke [4]. The effects of acute hyperglycemia might differ depending on the stroke subtype, as it worsens the outcome of cortical infarction but not lacunar stroke [5, 6]. Hyperglycemia has also been associated with more hemorrhagic complications following thrombolytic therapy [7] as well as with lower recanalization rates [8]. The worsening effects of hyperglycemia have extensively been demonstrated in experimental models of focal ischemia/reperfusion [e.g., 9–12].

✉ Carles Justicia  
cjmfat@iibb.csic.es

✉ Anna M. Planas  
anna.planas@iibb.csic.es

<sup>1</sup> Departament d'Isquemia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Rossello 161, planta 6, 08036 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rossello 161, planta 6, 08036 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Biomedical MR Imaging and Spectroscopy Group, Center for Image Sciences, University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands

<sup>4</sup> Comprehensive Stroke Center, Department of Neuroscience, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain



Oxidative stress and inflammation are involved in hyperglycemia-induced impairment of endothelial injury in transient ischemia [13]. Oxidative stress mediates pro-inflammatory effects of high glucose in cultured cells [14, 15]. Furthermore, acute hyperglycemia exacerbates tPA-induced hemorrhagic transformation in stroked rats by enhancing superoxide production [16]. Accordingly, antioxidants attenuate hyperglycemia-mediated brain endothelial cell dysfunction and BBB disruption [17]. Administration of the natural antioxidant uric acid (UA) was associated with a reduced infarct growth and improved outcome in stroke patients with hyperglycemia during acute stroke [18]. In this work, we studied the effect of hyperglycemia on inflammation and brain injury after transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in mice and tested whether treatment with UA after ischemia/reperfusion reduced the volume of infarction in hyperglycemic mice.

## Methods

### Animals

Adult (3–4 months of age) male C57BL/6J mice were obtained from Charles River (Lyon, France). Mice were kept in standard animal house conditions with controlled temperature and humidity with access to food and water. Animal work was conducted following the ARRIVE guidelines and in compliance with the local and European legislation with approval of the ethical committee of the University of Barcelona (CEEAA).

### Induction of Hyperglycemia

Hyperglycemia was induced by i.p. injection of dextrose (2 g/kg of body weight in 200  $\mu$ L per mice) (Sigma-Aldrich Quimica, S.L., Madrid, Spain) 45 min prior to ischemia. Normoglycemic mice received the vehicle (water). Blood samples were withdrawn before induction of ischemia and after reperfusion (15 and/or 75 min) to measure glucose levels (Accu-Check Sensor glucometer, Roche Diagnostics). Treatment was carried between 9:00 and 11:00 a.m.

### Brain Ischemia

Transient focal brain ischemia was induced by 45-min occlusion of the right middle cerebral artery (MCAo) followed by reperfusion, as reported in [19]. Mice were anesthetized with isoflurane by the aid of a facial mask. A filament (nylon monofilament 7/0, Sutures Aragón, Spain) heat blunted at the tip was introduced (11 mm) through the external carotid artery to the level where the MCA branches out. In addition, the ipsilateral common carotid artery (CCA) was clamped out. CBF was not measured in this study since in preliminary

experiments, we detected that implantation of the laser Doppler probe generated some artifacts in the T2\* Magnetic resonance imaging (MRI) images. Mice were allowed to recover from the anesthesia, and 45 min later, the mice were anesthetized again, the filament was cautiously removed, and the suture of the ipsilateral CCA was taken off to allow reperfusion. For sham operation, all surgical procedures were carried out but the filament was not inserted. Animals were allowed to recover from the anesthesia, and 24 h later, they were studied by MRI.

### Uric Acid Administration

A group of hyperglycemic mice received a 20-min i.v. infusion of UA (16 mg/kg body weight) ( $n = 12$ ) or vehicle (Locke's buffer) ( $n = 12$ ) through the femoral vein starting 45 min after reperfusion. The dose of UA was chosen based on previous reports of UA treatment in ischemic rats [20, 21, 27, 28]. Treatment was prepared and blinded every day and was randomly allocated to the mice. Investigators blinded to treatment allocation carried out the administration and obtained the outcome measures. Blood glucose concentration was measured before induction of hyperglycemia and 75 min following reperfusion, after verifying in a subgroup of mice ( $n = 6$  UA and  $n = 3$  vehicle) that the treatment did not modify blood glucose levels from 15 to 75 min of reperfusion (not shown).

### Preparation of Antibody-Functionalized MPIO

Antibody-functionalized micron-sized particles of iron oxide (MPIO, 1.05  $\mu$ m in diameter) were prepared as previously described [22]. Briefly, MPIOs (ProMag™ 1 Series, Bind-IT™ MPIO; 25 mg MPIO/mL with a 26.5% iron content; Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA) were resuspended in coupling buffer (50 mM 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid; pH 5.2). A monoclonal antibody against mouse intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ( $\alpha$ ICAM-1, YN1/1.7.4) or isotype-matched control IgG (IgG, RTK4530) (BioLegend, San Diego, CA, USA) was buffer exchanged to coupling buffer by centrifugation, resulting in a final antibody concentration of 1.0 mg/mL. MPIO and  $\alpha$ ICAM-1 or IgG (control) were mixed in a 1:1 (v/v) ratio and incubated for 60 min at room temperature. Following incubation, antibody–MPIO was buffer exchanged to storage solution (150 mM NaCl, 0.002% azide) by magnetic separation and kept at 4 °C.

### MRI

Imaging experiments were carried out 24 h after MCAo. The femoral vein was cannulated for injection of conjugated antibodies during the MRI acquisitions. MRI was conducted in a 7.0 T BioSpec 70/30 horizontal animal scanner (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany), equipped with a 12-cm inner



diameter actively shielded gradient system (400 mT/m). The receiver coil was a phased array surface coil for mouse brain. Mice were placed in a supine position in a Plexiglas holder with a nose cone for administering anesthesia (isoflurane in a mixture of 30% O<sub>2</sub> and 70% N<sub>2</sub>O); fixed with a tooth bar, ear bars, and adhesive tape; and maintained under controlled temperature during the acquisition period. Tripilot scans were used for accurate positioning of the animal's head in the isocenter of the magnet. For measures of infarct volume, T2 relaxometry maps were acquired with a multi-slice multi-echo acquisition sequence with 16 effective echo times increasing from 11 to 176 ms, slice thickness = 0.5 mm, number of slices = 18, repetition time (TR) = 4.764 ms, field of view = 20 × 20 mm<sup>2</sup>, matrix size = 256 pixels, and in-plane spatial resolution = 0.078 mm. Two consecutive T2\*-weighted data sets were acquired (before and 1 h after i.v injection of αICAM-1-MPIO or IgG-MPIO conjugated antibody) using gradient echo sequence with the following acquisition parameters: field of view = 2.0 × 2.0 × 0.4 cm<sup>3</sup>, matrix = 256 × 256 × 64, spatial resolution = 78 × 78 × 200 μm<sup>3</sup>, TR/TE = 508/18 ms, number of slices = 19, number of averages = 30, and excitation pulse angle = 30°. Data were processed using the Paravision 5.1 software (Bruker). Infarct volume was calculated from the T2 maps using the NIH ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

The area of infarction was measured in each brain slice by manual outlining the zone with abnormally hyperintense tissue, and the total infarct volume was obtained by summation of the infarcted areas multiplied by the slice thickness. A correction for edema was made in each area by multiplying the infarct area by the ratio of the contralateral to the ipsilateral hemisphere. The extent of edema was assessed by calculating the difference between the ipsilateral and the contralateral hemisphere volumes and expressing it as the percentage of the contralateral hemisphere volume. Mean signal intensity (SI) of T2\*-W images from ipsilateral and contralateral hemispheres were calculated. Signal intensity 1 h after contrast injection was expressed relative to signal intensity before contrast. The volume of contrast-enhanced voxels (CE) per hemisphere was calculated considering voxels with more than two SD signal difference from the initial T2\*-weighted SI, expressed as a percentage of total hemispheric volume. Mice were assigned a code that did not reveal the identity of the groups, and images were analyzed in a blind fashion.

### Immunofluorescence

At 24 h post-ischemia and immediately after T2w MRI, a group of mice was anesthetized with isoflurane and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde. The brain was removed and kept overnight with this fixative; then, it was cryoprotected in 30% sucrose and frozen at -80 °C. Cryostat brain sections (14-μm thick) were fixed with acetone, blocked with rabbit serum, and incubated overnight at 4 °C with either a

mouse monoclonal primary antibody against ICAM-1 (no. 14-0542, eBioscience) diluted 1:500, rat monoclonal antibodies against the neutrophil antigen NIMP-RP14 (no. ab46154, Abcam), or Ly6G (clone 1A8, BioLegend) or a rabbit polyclonal antibody against pan-laminin (no. Z0097, Dako) diluted 1:100. Then, sections were incubated for 2 h at room temperature with appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 546; Molecular Probes; Life Technologies S.A.). Immunoreaction controls were carried out by omission of the primary antibodies. Sections were counterstained with TO-PRO®-3 (Life Technologies) to visualize the cell nuclei and were observed under a confocal microscope (TCS SPE, Leica Microsystems, Barcelona, Spain). For neutrophil cell counting, pictures of Ly6G (green) and pan-laminin (red) immunostaining were taken through the lesion zone of the ipsilateral cortex ( $n = 5$ ) and striatum ( $n = 3$ ) in three different brain sections for each mouse (×40 objective) sampling the whole affected tissue, including core and periphery. The number of neutrophils extravasated to the brain parenchyma and associated to the blood vessels was counted in each picture. The average of the cell numbers obtained in the different pictures for each brain region was taken as representative of each mouse. Superimages of whole brain sections were generated after taking pictures with the ×20 objective through all the sectional area in a stereologic microscope (Olympus BX51) using the VIS 3.2.4 software.

### Flow Cytometry

Another group of mice was anesthetized, perfused through the heart with saline, and the brain was removed at 24 h post-ischemia. The ipsilateral and contralateral hemispheres were dissected out and separately processed for flow cytometry. Brain cells were isolated and processed as described in [23] and were incubated with the following primary antibodies: rat antimouse CD11b (clone M1/70, Alexa Fluor 647, BD Pharmingen), CD45 (clone 30-F11, FITC, BD Pharmingen), and Ly6G (clone 1A8, PE-Cy7, BD Pharmingen). Isotype controls were rat IgG2bκ (clone A95-1, Alexa Fluor 647 or FITC, BD Pharmingen), rat IgG2a (FITC, Hycult Biotech), and rat IgG2aκ (clone R35-95, PE-Cy7, BD Pharmingen). Data acquisition was carried out in a BD FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) using the FACSDiva software (BD Biosciences). Data analysis was carried out with the FlowJo software (version 7.6.5, Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter) were used for absolute cell number quantification.

### Statistical Analyses

Comparisons between two groups were carried out with the Mann-Whitney *U* test or the *t* test as appropriate. Group comparisons by condition (normoglycemia vs. hyperglycemia) and antibody treatment (IgG or αICAM-1) were carried out with



diameter actively shielded gradient system (400 mT/m). The receiver coil was a phased array surface coil for mouse brain. Mice were placed in a supine position in a Plexiglas holder with a nose cone for administering anesthesia (isoflurane in a mixture of 30% O<sub>2</sub> and 70% N<sub>2</sub>O); fixed with a tooth bar, ear bars, and adhesive tape; and maintained under controlled temperature during the acquisition period. Tripilot scans were used for accurate positioning of the animal's head in the isocenter of the magnet. For measures of infarct volume, T2 relaxometry maps were acquired with a multi-slice multi-echo acquisition sequence with 16 effective echo times increasing from 11 to 176 ms, slice thickness = 0.5 mm, number of slices = 18, repetition time (TR) = 4.764 ms, field of view = 20 × 20 mm<sup>2</sup>, matrix size = 256 pixels, and in-plane spatial resolution = 0.078 mm. Two consecutive T2\*-weighted data sets were acquired (before and 1 h after i.v injection of αICAM-1-MPIO or IgG-MPIO conjugated antibody) using gradient echo sequence with the following acquisition parameters: field of view = 2.0 × 2.0 × 0.4 cm<sup>3</sup>, matrix = 256 × 256 × 64, spatial resolution = 78 × 78 × 200 μm<sup>3</sup>, TR/TE = 508/18 ms, number of slices = 19, number of averages = 30, and excitation pulse angle = 30°. Data were processed using the Paravision 5.1 software (Bruker). Infarct volume was calculated from the T2 maps using the NIH ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

The area of infarction was measured in each brain slice by manual outlining the zone with abnormally hyperintense tissue, and the total infarct volume was obtained by summation of the infarcted areas multiplied by the slice thickness. A correction for edema was made in each area by multiplying the infarct area by the ratio of the contralateral to the ipsilateral hemisphere. The extent of edema was assessed by calculating the difference between the ipsilateral and the contralateral hemisphere volumes and expressing it as the percentage of the contralateral hemisphere volume. Mean signal intensity (SI) of T2\*-W images from ipsilateral and contralateral hemispheres were calculated. Signal intensity 1 h after contrast injection was expressed relative to signal intensity before contrast. The volume of contrast-enhanced voxels (CE) per hemisphere was calculated considering voxels with more than two SD signal difference from the initial T2\*-weighted SI, expressed as a percentage of total hemispheric volume. Mice were assigned a code that did not reveal the identity of the groups, and images were analyzed in a blind fashion.

### Immunofluorescence

At 24 h post-ischemia and immediately after T2<sub>w</sub> MRI, a group of mice was anesthetized with isoflurane and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde. The brain was removed and kept overnight with this fixative; then, it was cryoprotected in 30% sucrose and frozen at -80 °C. Cryostat brain sections (14-μm thick) were fixed with acetone, blocked with rabbit serum, and incubated overnight at 4 °C with either a

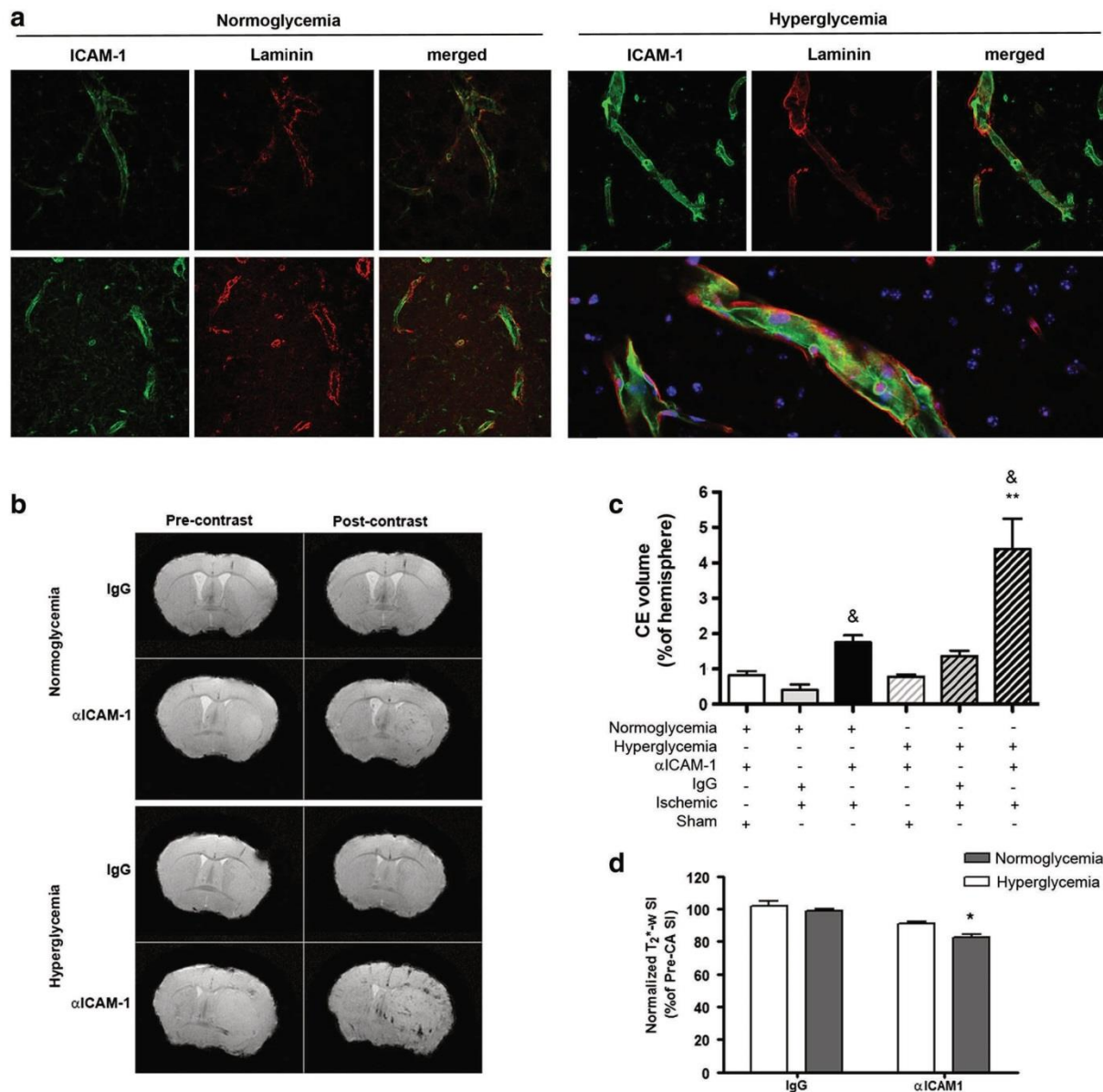
mouse monoclonal primary antibody against ICAM-1 (no. 14-0542, eBioscience) diluted 1:500, rat monoclonal antibodies against the neutrophil antigen NIMP-RP14 (no. ab46154, Abcam), or Ly6G (clone 1A8, BioLegend) or a rabbit polyclonal antibody against pan-laminin (no. Z0097, Dako) diluted 1:100. Then, sections were incubated for 2 h at room temperature with appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 546; Molecular Probes; Life Technologies S.A.). Immunoreaction controls were carried out by omission of the primary antibodies. Sections were counterstained with TO-PRO®-3 (Life Technologies) to visualize the cell nuclei and were observed under a confocal microscope (TCS SPE, Leica Microsystems, Barcelona, Spain). For neutrophil cell counting, pictures of Ly6G (green) and pan-laminin (red) immunostaining were taken through the lesion zone of the ipsilateral cortex (*n* = 5) and striatum (*n* = 3) in three different brain sections for each mouse (×40 objective) sampling the whole affected tissue, including core and periphery. The number of neutrophils extravasated to the brain parenchyma and associated to the blood vessels was counted in each picture. The average of the cell numbers obtained in the different pictures for each brain region was taken as representative of each mouse. Superimages of whole brain sections were generated after taking pictures with the ×20 objective through all the sectional area in a stereologic microscope (Olympus BX51) using the VIS 3.2.4 software.

### Flow Cytometry

Another group of mice was anesthetized, perfused through the heart with saline, and the brain was removed at 24 h post-ischemia. The ipsilateral and contralateral hemispheres were dissected out and separately processed for flow cytometry. Brain cells were isolated and processed as described in [23] and were incubated with the following primary antibodies: rat antimouse CD11b (clone M1/70, Alexa Fluor 647, BD Pharmingen), CD45 (clone 30-F11, FITC, BD Pharmingen), and Ly6G (clone 1A8, PE-Cy7, BD Pharmingen). Isotype controls were rat IgG2bκ (clone A95-1, Alexa Fluor 647 or FITC, BD Pharmingen), rat IgG2a (FITC, Hycult Biotech), and rat IgG2aκ (clone R35-95, PE-Cy7, BD Pharmingen). Data acquisition was carried out in a BD FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) using the FACSDiva software (BD Biosciences). Data analysis was carried out with the FlowJo software (version 7.6.5, Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter) were used for absolute cell number quantification.

### Statistical Analyses

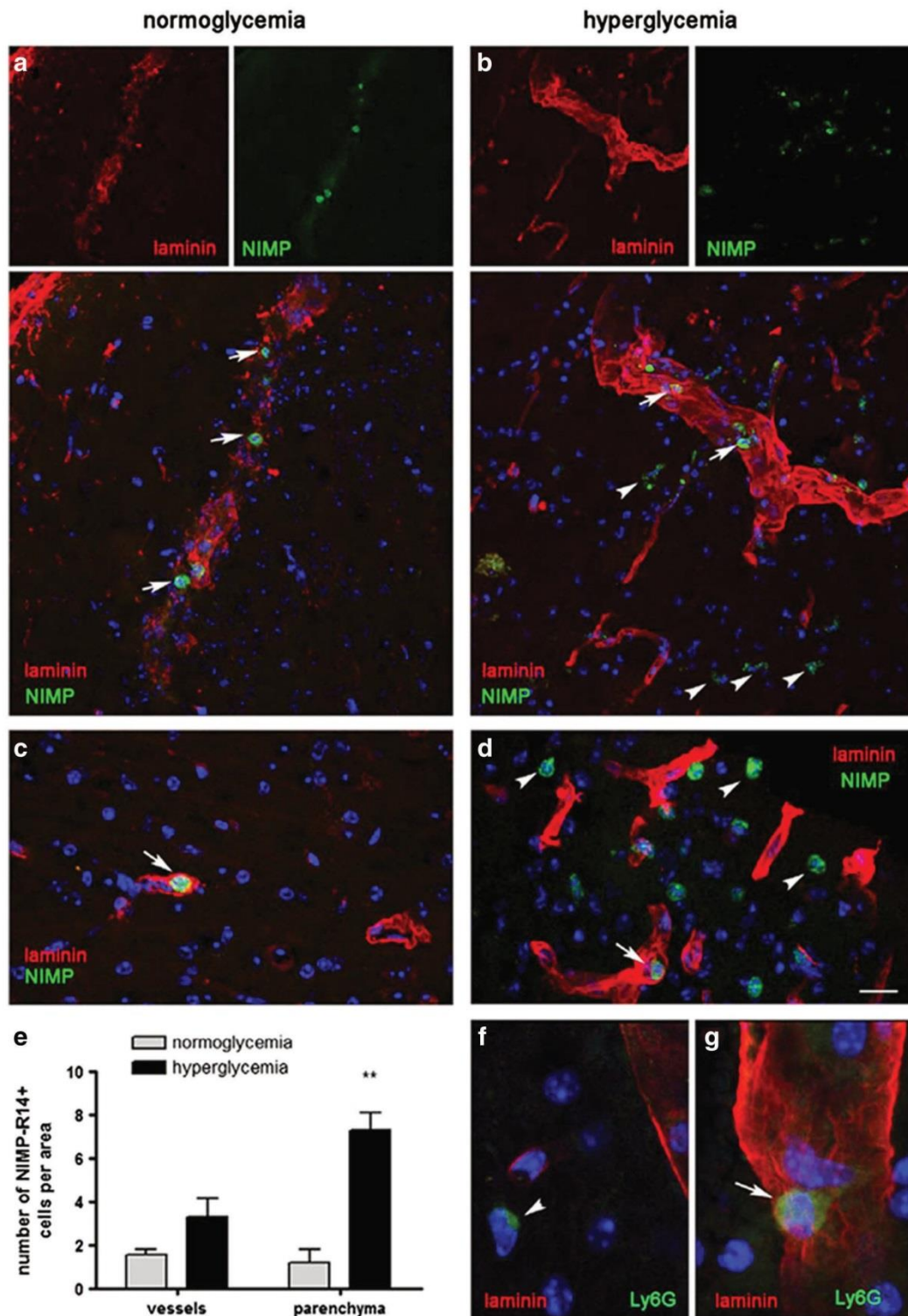
Comparisons between two groups were carried out with the Mann-Whitney *U* test or the *t* test as appropriate. Group comparisons by condition (normoglycemia vs. hyperglycemia) and antibody treatment (IgG or αICAM-1) were carried out with



**Fig. 2** Hyperglycemia increases vascular ICAM-1 expression. **a** Immunofluorescence using anti-ICAM-1 antibodies and confocal microscopy shows higher intensity of staining in the blood vessels of the ischemic hemisphere of hyperglycemic mice ( $n = 5$ ) than normoglycemic mice ( $n = 3$ ), as illustrated in representative images of each group. **b** Molecular MRI of vascular ICAM-1 expression was studied following administration of  $\alpha$ ICAM-1-functionalized MPIOs or IgG-bound MPIOs (control) ( $n = 3$ – $5$  mice per group) in normoglycemic and hyperglycemic mice 24 h after MCAo or sham operation.  $T_2^*w$  MRI images of representative mice per group are shown before (pre-contrast) and after (post-contrast) MPIO administration to illustrate the presence of zones with lower signal intensity (*darker spots*) in the right (ischemic) hemisphere after administration of  $\alpha$ ICAM-1 MPIOs ( $\alpha$ ICAM-1) but not of control MPIOs (IgG). **c** Quantification of the volume of contrast enhancement (expressed as % of hemispheric volume) and statistical

analysis (one-way ANOVA followed by the Bonferroni tests) shows significant increases after  $\alpha$ ICAM-1 MPIO administration in ischemic mice versus sham-operated mice and versus ischemic mice receiving the control MPIOs (*ampersand* indicates  $p < 0.05$ ), both under normoglycemic and hyperglycemic conditions. However, hyperglycemic ischemic mice show higher increases than normoglycemic ischemic mice following  $\alpha$ ICAM-1 MPIO administration (\*\* $p < 0.01$ ). **d** Furthermore,  $\alpha$ ICAM-1 MPIO administration causes a larger drop of the  $T_2^*w$  signal intensity (SI) in hyperglycemic mice than normoglycemic mice, whereas administration of control IgG MPIOs shows no effect (two-way ANOVA and Bonferroni test, \* $p < 0.05$ ). For each mouse, signal intensity values after MPIO administration were normalized to the corresponding signal intensity values prior to MPIO administration (pre-contrast administration, pre-CA) and data are expressed as percentage of pre-CA





were injected i.v. 24 h following MCAo or sham operation in normoglycemic and hyperglycemic mice. Mice received a T2\* scan immediately before and 1 h after MPIO administration.

$\alpha$ ICAM-1-MPIOs, but not control-MPIOs, caused T2\* hypointensities (dark spots) in the ipsilateral hemisphere of the ischemic group but not in the sham-operated group (Fig. 2b).



**Fig. 3** Hyperglycemia increases neutrophil infiltration after ischemia/reperfusion. The presence of neutrophils in the ischemic tissue was examined by immunofluorescence and confocal microscopy using anti-NIMP-RP14 or anti-Ly6G antibodies (green) in normoglycemic (a, c) and hyperglycemic (b, d, f, g) mice 24 h following MCAo (images are representative of  $n = 3-4$  mice per group). The basal lamina of the blood vessels is stained with an antibody anti-laminin (red), and the nuclei are visualized with TO-PRO-3 (blue). Arrows point to neutrophils associated to the vasculature, and arrowheads point to neutrophils extravasated to the brain parenchyma. Quantification of the number of neutrophils per area shows a significant increase in neutrophils infiltrated in the parenchyma in hyperglycemic versus normoglycemic mice (two-way ANOVA and Bonferroni test,  $**p < 0.01$ ). Scale bar a, b: 40  $\mu\text{m}$ ; c, d: 15  $\mu\text{m}$ ; f, g: 7  $\mu\text{m}$

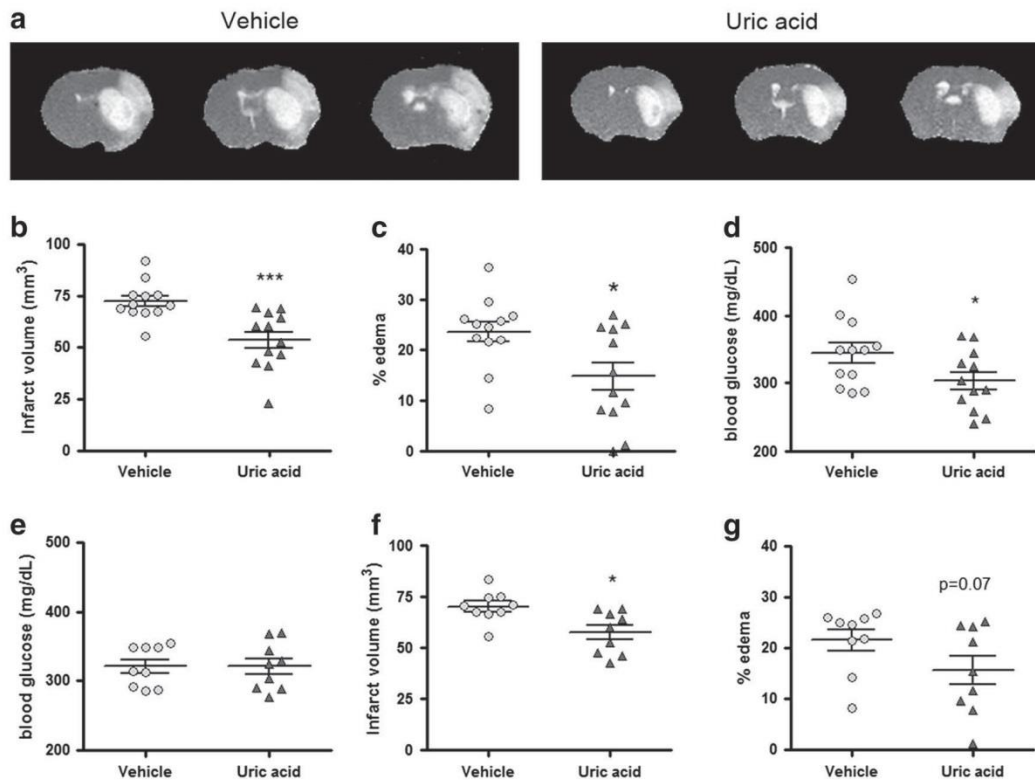
Measurement of the percentage of hemispheric area showing  $\alpha\text{ICAM-1-MPIO}$ -induced contrast enhancement showed higher values in the hyperglycemic mice (Fig. 2c).  $\alpha\text{ICAM-1-MPIO}$ , but not control-MPIO, also lowered the normalized  $T2^*w$  signal intensity value in the hyperglycemic group versus the normoglycemic group (two-way ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2d),

indicating higher binding of the  $\alpha\text{ICAM-1-MPIOs}$  in the hyperglycemic compared with the normoglycemic group.

ICAM-1 is involved in neutrophil adhesion to the vasculature [24], suggesting that hyperglycemia-induced ICAM-1 could promote neutrophil recruitment to the ischemic tissue. Accordingly, hyperglycemic mice showed a significant increase in the number of extravasated neutrophils compared to normoglycemic mice 24 h post-ischemia (Fig. 3).

#### UA Was Protective in Hyperglycemic Mice

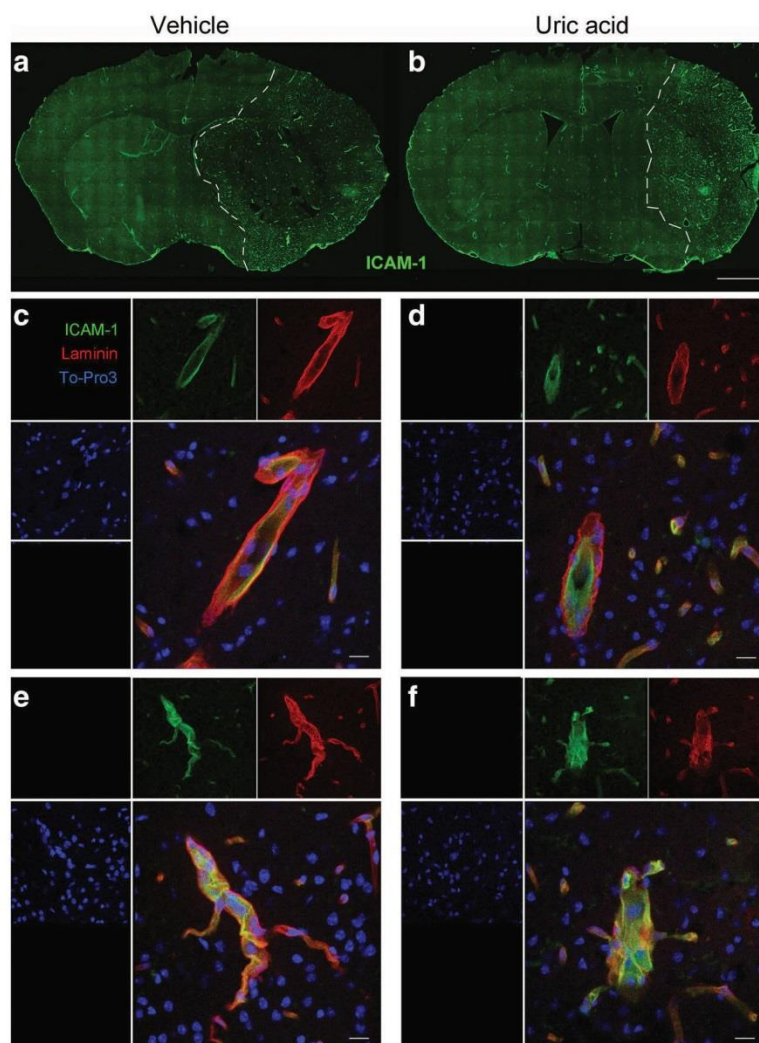
Oxidative stress is recognized as a main mechanism mediating the detrimental effects of hyperglycemia [13, 25]. We investigated whether the worsening effects of hyperglycemia in brain ischemia could be attenuated by treatment with the potent natural antioxidant UA [26]. Mortality after ischemia/reperfusion in hyperglycemic mice was similar in both groups, i.e., 35% in the vehicle group and 33% in the UA group.



**Fig. 4** Uric acid reduces the brain lesion in hyperglycemic mice. Hyperglycemic mice received i.v. administration of the vehicle or uric acid 45 min following reperfusion after 45-min MCAo ( $n = 12$  per group), and  $T2w$  MRI was performed at 24 h. a Images illustrate three different brain levels of a representative mouse per each group. b Infarct volume is significantly smaller in the uric acid group than in the vehicle group (Mann–Whitney test,  $***p < 0.001$ ). c The degree of edema is also smaller in the uric acid compared with the vehicle group (Mann–Whitney test,  $*p < 0.05$ ). d Blood glucose in the vehicle group is higher than in the uric acid group ( $t$  test,  $*p < 0.05$ ). e For a subgroup analysis,

we set an inclusion criteria based on blood glucose within a defined range ( $>260$  and  $<390$  mg/dL) in order to compare group infarct volumes at similar blood glucose levels. Accordingly, three animals per group were excluded from the subanalysis. Nine animals per group with similar blood glucose levels ( $t$  test,  $p = 0.98$ ) were included in the subanalysis. f In the latter groups of mice, infarct volume is smaller in the uric acid group than in the vehicle group (Mann–Whitney test,  $*p < 0.05$ ). g The corresponding degree of edema tends to be smaller in the uric acid group than in the vehicle group (Mann–Whitney test,  $p = 0.07$ )

**Fig. 5** Blood vessels in the ischemic tissue of hyperglycemic mice show ICAM-1 expression in both treatment groups. After 45-min ischemia in hyperglycemic mice, the animals received i.v. administration of either the vehicle (**a, c, e**) or uric acid (**b, d, f**) ( $n = 7$  mice per group). Brain sections were obtained at 24 h for immunofluorescence. **a, b** Images show brain sections reconstructed from ICAM-1 immunofluorescence (*green*) pictures obtained with the  $\times 20$  objective of a stereologic microscope. ICAM-1 positive vessels are prominent in the ischemic tissue (indicated with a *dashed line*) in both treatment groups. **c–f** Representative confocal microscopy images of the ischemic tissue of mice treated with the vehicle (**c, e**) or uric acid (**d, f**) are shown. Immunostainings are ICAM-1 (*green*) and pan-laminin (*red*), and cell nuclei are stained with TO-PRO-3 (*blue*). Blood vessels strongly positive for ICAM-1 are seen in both treatment groups. Scale bars: **a, b** 1 mm; **c–f** 15  $\mu\text{m}$



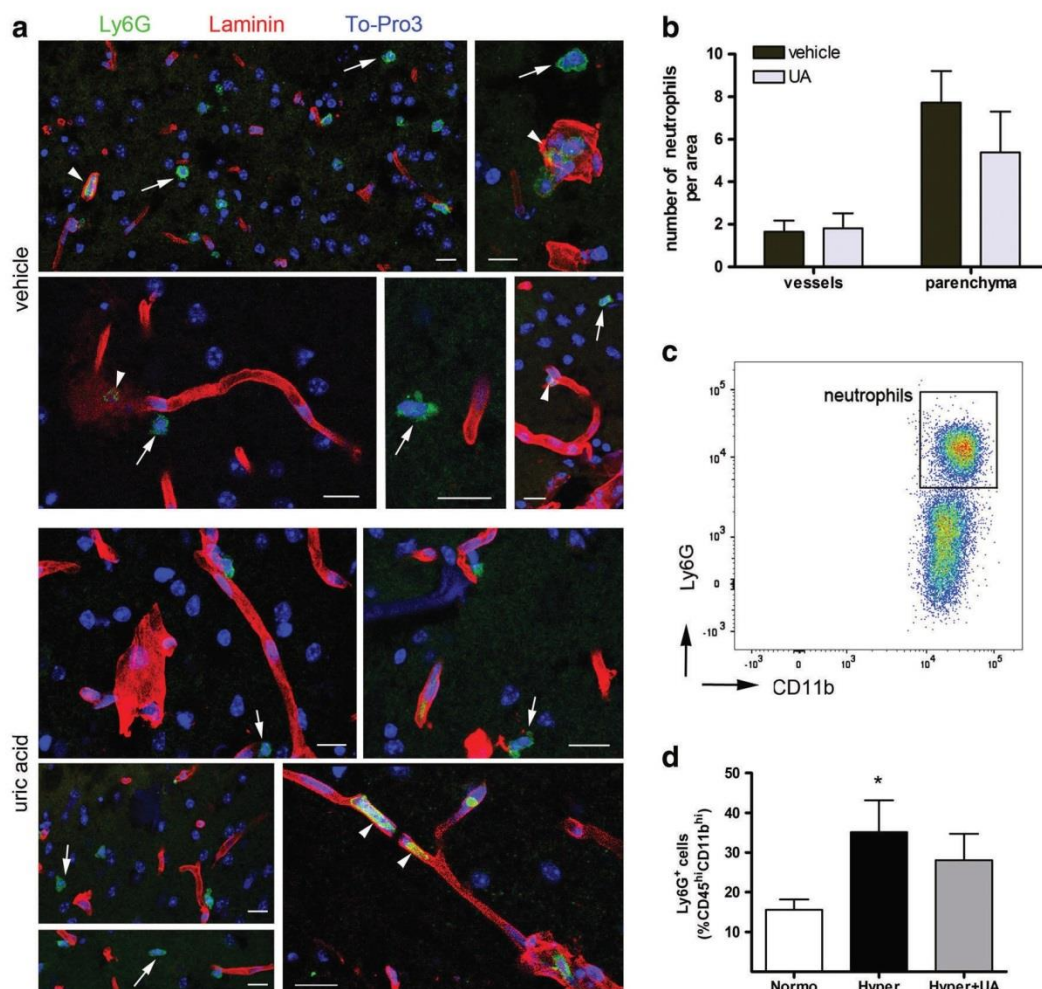
Hyperglycemic mice treated with UA ( $n = 12$ ) showed smaller infarct volumes ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4a, b) and less edema ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4c) than hyperglycemic mice receiving the vehicle ( $n = 12$ ). The percentage of decrease in lesion volume was 26% (mean infarct volume  $\pm$  SD was  $72.3 \pm 9.1 \text{ mm}^3$  in the vehicle group and  $53.5 \pm 14.0 \text{ mm}^3$  in the uric acid group). For the vehicle group that exhibited a mean glucose concentration higher than the UA group (Fig. 4d), we assessed the effect of UA adjusted for blood glucose concentration showing that UA treatment was inversely correlated to infarct volume ( $p = 0.007$ ), thus supporting a beneficial effect of UA regardless of the differences in blood glucose levels between groups. An exploratory analysis in mice with comparable blood glucose concentrations (ranging between  $<390$  and  $>260 \text{ mg/dL}$ ) (Fig. 4e, f) further confirmed that the infarct volume was significantly lower (18%) in the UA subgroup compared to the vehicle subgroup ( $p = 0.01$ ) (Fig. 4g) (infarct

volume  $\pm$  SD was  $70.3 \pm 7.7 \text{ mm}^3$  in the vehicle group and  $57.6 \pm 10.5 \text{ mm}^3$  in the uric acid group) and showed a trend to reduction of edema in the UA group ( $p = 0.07$ ) (Fig. 4h).

#### UA Did Not significantly Prevent the Higher Expression of ICAM-1 in the Brain Vasculature and Neutrophil Infiltration Induced by Hyperglycemia

We then studied by confocal microscopy whether UA altered the expression of vascular ICAM-1 (Fig. 5a) and the presence of neutrophils (Fig. 6b, c) in the ischemic tissue of hyperglycemic mice. UA treatment did not prevent the hyperglycemia-exaggerated expression of ICAM-1 in the brain vasculature of ischemic mice (Fig. 5). UA also did not significantly reduce the numbers of neutrophils extravasated to the ischemic brain tissue (Fig. 6a, b). To verify this latter finding, we quantified the neutrophils in the ischemic





**Fig. 6** Uric acid does not significantly reduce neutrophil infiltration in hyperglycemic mice after MCAo. Neutrophil infiltration in the ischemic tissue of hyperglycemic mice treated with either the uric acid or the vehicle was studied by immunofluorescence and confocal microscopy (**a, b**) or flow cytometry (**c, d**) 24 h post-ischemia. **a** Ly6G<sup>+</sup> (green) neutrophils associated to the blood vessels, indicated by arrowheads, or free in the brain parenchyma, indicated by arrowheads, are seen in the ischemic tissue of hyperglycemic mice receiving the vehicle or uric acid. The basal lamina of the blood vessels is stained with pan-laminin (red), and the cell nuclei are stained with TO-PRO-3 (blue). **b** Quantification of the number of neutrophils per area ( $n = 7$  mice per group) shows no

statistically significant differences between treatment groups in vascular or parenchymal neutrophil numbers (two-way ANOVA). **c** Neutrophils (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup> cells) in the ischemic tissue were studied by flow cytometry. A representative plot is shown to illustrate the neutrophil gate (CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup>). **d** Analysis of flow cytometry data shows a higher proportion of neutrophils (one-way ANOVA and Bonferroni test) among the infiltrated cells (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> cells) in the ischemic tissue of hyperglycemic ( $n = 10$ ) than of normoglycemic ( $n = 10$ ) mice ( $*p < 0.05$ ). Uric acid treatment in hyperglycemic mice ( $n = 7$ ) does not significantly reduce the percentage of neutrophils in the ischemic brain tissue. Scale bars: 15 μm

tissue by flow cytometry (Fig. 6c, d). Hyperglycemia increased the percentage of Ly6G<sup>+</sup> neutrophils in the ischemic brain tissue versus that in the normoglycemic mice (Kruskal–Wallis test,  $p < 0.05$ ) but UA did not significantly reduce this effect (Fig. 6d).

## Discussion

This study shows that the natural antioxidant UA is protective following ischemia/reperfusion in hyperglycemic mice thus

extending previous studies performed under experimental normoglycemic conditions [20, 21, 27, 28]. Hyperglycemia increased the expression of vascular ICAM-1 and neutrophil infiltration to the brain tissue and exacerbated brain damage following ischemia reperfusion. UA reduced the volume of infarction in hyperglycemic mice, but UA therapy failed to show a significant reduction in the recruitment of neutrophils to the ischemic brain tissue induced by hyperglycemia. Yet, identification of the latter effect would have required larger studies given the high variability of neutrophil numbers in this experimental model.



Stress hyperglycemia is associated to reperfusion injury in experimental models of MCAo [e.g., 9–12] since it impairs vascular function [29, 30] and increases blood-brain barrier damage and matrix metalloproteinase-9 activation [10, 31]. High glucose concentration stimulates the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B and triggers inflammation [32], increasing the expression of endothelial adhesion molecules such as ICAM-1, P-selectin, and E-selectin [33]. Diabetic rats also show higher ICAM-1 expression after transient global ischemia [34]. In vivo MRI molecular imaging of ICAM-1 induction in the brain using ICAM-1-functionalized contrast agents based on T2\*-shortening micron-sized iron oxide particles (MPIO) [22] showed an increased adhesion of  $\alpha$ ICAM-1 MPIOs to the cerebral vessel walls after tMCAo in hyperglycemic compared with normoglycemic mice. ICAM-1 is recognized as a crucial molecular determinant for neutrophil adhesion to the vessel wall [24]. In a previous study, we showed that blocking ICAM-1 in vivo with antibodies abrogated the presence of myeloperoxidase in the rat brain after tMCAo, suggesting that ICAM-1 was involved in neutrophil adhesion to the brain vasculature after ischemia/reperfusion [35]. In the current study, the increased ICAM-1 expression in the brain vessels of hyperglycemic mice was accompanied by an increased infiltration and extravasation of neutrophils to the ischemic brain parenchyma. This finding is in agreement with larger infarct volume in hyperglycemic mice and with previous reports showing enhanced neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells under hyperglycemic conditions [33] and increased neutrophil recruitment to the ischemic brain tissue after tMCAo in hyperglycemic rats [10, 36].

Oxidative stress is a main detrimental effect of hyperglycemia in ischemia/reperfusion [25]. Hyperglycemia favors the production of superoxide by NADPH oxidase, particularly at reperfusion [37]. UA is a potent natural antioxidant that has been claimed to exert preventive actions in the development of age-related neurodegenerative diseases [38]. Administration of UA to rats after cerebral ischemia/reperfusion reduces brain damage and improves the behavioral outcome [20, 21, 27, 28, 39]. UA protects against vascular damage mediated by oxidative stress following ischemia/reperfusion in rats [21] and shows additive benefits to the protective action of tPA in a rat thromboembolic stroke model [20]. UA has been taken to the clinic in the URICO-ICTUS trial, a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial that recruited 421 acute ischemic stroke patients [40]. Notably, UA reduced infarct growth and improved significantly the clinical outcome in patients with hyperglycemia during acute stroke [18]. Accordingly, the current findings demonstrate beneficial effects of UA in cerebral ischemia/reperfusion in hyperglycemic mice. Overall, the infarct volume reduction by UA after ischemia/reperfusion in hyperglycemic mice was relatively small (26%) but robust. Further, UA only showed a non-

significant reduction in the recruitment of neutrophils to the ischemic brain tissue induced by hyperglycemia that might be attributable to the smaller infarct size in this group. While UA does not seem to play a major role preventing neutrophil infiltration, it might attenuate the potential pro-oxidant effects of neutrophils [41]. UA could also have contributed to reduce the volume of infarction in hyperglycemic mice through mechanisms independent of neutrophil infiltration including a more efficient clearance of peroxynitrite-derived free radicals that limits glucose toxicity and secondary cell death [42].

Our study has some limitations, notably, the fact that we only measured the outcome in the acute phase of stroke. Behavioral studies were not performed because the treatment administered through the femoral vein involved intervention on the hind limb that precluded an accurate behavioral assessment. Further studies are required to validate long-term benefits of UA in experimental animals. Also, in the current study, UA was administered 1.5 h after MCAo. Studies with drug administration at later time points after ischemia are required for clinical translation.

## Conclusions

In conclusion, high blood glucose increases vascular ICAM-1 expression and neutrophil infiltration and exacerbates brain damage following ischemia/reperfusion. While oxidative stress does not seem to mediate the exaggerated vascular ICAM-1 expression and recruitment of neutrophils to the ischemic tissue under hyperglycemic conditions, it is involved in the worsening effects of hyperglycemia since treatment with UA after ischemia/reperfusion reduces the size of the brain lesion in hyperglycemic mice.

**Acknowledgements** We thank Ms. Alba Hernández for the excellent technical assistance. We are indebted to the image platform of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for technical support.

**Compliance with Ethical Standards** Animal work was conducted with approval of the ethical committee of the University of Barcelona (CEEA) and in accordance with the EU Directive 2010/63/EU and the Spanish and autonomous Catalan laws (Real Decreto 53/2013 and Decreto 214/1997).

**Conflict of Interest** Dr. Chamorro is inventor of the patent, "Pharmaceutical composition for neuroprotective treatment in patients with ictus comprising citicoline and uric acid" (no. 20120108532). The other authors report no conflicts.

**Funding Information** This work was supported by the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (SAF2014-56279R and DPI2015-64358-C2-2-R) and the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO; VIDI 917.76.347).



## References

- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke*. 2001;32:2426–32.
- Kruyt ND, Biessels GJ, Devries JH, Roos YB. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: pathophysiology and clinical management. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:145–55.
- Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2012;11:261–71.
- Middleton S, McElduff P, Ward J, Grimshaw JM, Dale S, D'Este C, Drury P, Griffiths R, Cheung NW, Quinn C, Evans M, Cadilhac D, Levi C, QASC Trialists Group. Implementation of evidence-based treatment protocols to manage fever, hyperglycaemia, and swallowing dysfunction in acute stroke (QASC): a cluster randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;378:1699–706.
- Uyttenboogaart M, Koch MW, Stewart RE, Vroomen PC, Luijckx GJ, De Keyser J. Moderate hyperglycaemia is associated with favourable outcome in acute lacunar stroke. *Brain*. 2007;130:1626–30.
- Kruyt ND, Nys GM, van der Worp HB, van Zandvoort MJ, Kappelle LJ, Biessels GJ. Hyperglycemia and cognitive outcome after ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2008;270:141–7.
- Bruno A, Levine SR, Frankel MR, et al. NINDS rt-PA Stroke Study Group. Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Neurology*. 2002;59:669–74.
- Ribo M, Molina C, Montaner J, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Quintana M, Alvarez-Sabín J. Acute hyperglycemia state is associated with lower tPA-induced recanalization rates in stroke patients. *Stroke*. 2005;36:1705–9.
- Yip PK, He YY, Hsu CY, Garg N, Marangos P, Hogan EL. Effect of plasma glucose on infarct size in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neurology*. 1991;41:899–905.
- Martín A, Rojas S, Chamorro A, Falcón C, Bargallón N, Planas AM. Why does acute hyperglycemia worsen the outcome of transient focal cerebral ischemia? Role of corticosteroids, inflammation, and protein O-glycosylation. *Stroke*. 2006;37:1288–95.
- Tarr D, Graham D, Roy LA, Holmes WM, McCabe C, Mhairi Macrae I, Muir KW, Dewar D. Hyperglycemia accelerates apparent diffusion coefficient-defined lesion growth after focal cerebral ischemia in rats with and without features of metabolic syndrome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:1556–63.
- MacDougall NJ, Muir KW. Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31:807–18.
- Tsuruta R, Fujita M, Ono T, Koda Y, Koga Y, Yamamoto T, Nanba M, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res*. 2010;1309:155–63.
- Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2007;99:15B–26B.
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2970–3.
- Won SJ, Tang XN, Suh SW, Yenari MA, Swanson RA. Hyperglycemia promotes tissue plasminogen activator-induced hemorrhage by increasing superoxide production. *Ann Neurol*. 2011;70:583–90.
- Allen CL, Bayraktutan U. Antioxidants attenuate hyperglycaemia-mediated brain endothelial cell dysfunction and blood-brain barrier hyperpermeability. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11:480–90.
- Amaro S, Llull L, Renú A, Laredo C, Perez B, Vila E, Torres F, Planas AM, Chamorro Á. Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2015;77:775–83.
- de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C, Durduran T, Chamorro Á, Planas AM. Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke*. 2014;45:1453–9.
- Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:14–20.
- Onetti Y, Dantas AP, Pérez B, Cugota R, Chamorro A, Planas AM, Vila E, Jiménez-Altayó F. Middle cerebral artery remodeling following transient brain ischemia is linked to early posts ischemic hyperemia: a target of uric acid treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308:H862–74.
- Deddens LH, van Tilborg GA, van der Toorn A, van der Marel K, Paulis LE, van Bloois L, Storm G, Strijkers GJ, Mulder WJ, de Vries HE, Dijkhuizen RM. MRI of ICAM-1 upregulation after stroke: the importance of choosing the appropriate target-specific particulate contrast agent. *Mol Imaging Biol*. 2013;15:411–22.
- Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urta X, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol*. 2015;129:239–57.
- Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res*. 1994;74:336–43.
- Robbins NM, Swanson RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. *Stroke*. 2014;45:1881–6.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:615–31.
- ZF Y, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998;53:613–25.
- Ma YH, Su N, Chao XD, Zhang YQ, Zhang L, Han F, Luo P, Fei Z, Qu Y. Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress. *Neurochem Int*. 2012;60:475–83.
- Ergul A, Li W, Elgebaly MM, Bruno A, Fagan SC. Hyperglycemia, diabetes and stroke: focus on the cerebrovasculature. *Vasc Pharmacol*. 2009;51:44–9.
- Fabian RH, Kent TA. Hyperglycemia accentuates persistent “functional uncoupling” of cerebral microvascular nitric oxide and superoxide following focal ischemia/reperfusion in rats. *Transl Stroke Res*. 2012;3:482–90.
- Kamada H, Yu F, Nito C, Chan PH. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke*. 2007;38:1044–9.
- Iwasaki Y, Kambayashi M, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Hashimoto K. High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro. *J Diabetes Complicat*. 2007;21:56–62.
- Omi H, Okayama N, Shimizu M, Okouchi M, Ito S, Fukutomi T, Itoh M. Participation of high glucose concentrations in neutrophil adhesion and surface expression of adhesion molecules on cultured human endothelial cells: effect of antidiabetic medicines. *J Diabetes Complicat*. 2002;16:201–8.
- Ding C, He Q, Li PA. Diabetes increases expression of ICAM after a brief period of cerebral ischemia. *J Neuroimmunol*. 2005;161:61–7.

35. Justicia C, Panés J, Solé S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1430–40.
36. Lin B, Ginsberg MD, Busto R, Li L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2000;278:1–4.
37. Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, Yenari MA, Swanson RA. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol.* 2008;64:654–63.
38. Cutler RG, Camandola S, Malott KF, Edelhauser MA, Mattson MP. The role of uric acid and methyl derivatives in the prevention of age-related neurodegenerative disorders. *Curr Top Med Chem.* 2015;15:2233–8.
39. Haberman F, Tang SC, Arumugam TV, Hyun DH, QS Y, Cutler RG, Guo Z, Holloway HW, Greig NH, Mattson MP. Soluble neuroprotective antioxidant uric acid analogs ameliorate ischemic brain injury in mice. *Neuromol Med.* 2007;9:315–23.
40. Chamorro A, Amaro S, Castellanos M, Segura T, Arenillas J, Martí-Fàbregas J, Gállego J, Krupinski J, Gomis M, Cánovas D, Camé X, Deulofeu R, Román LS, Oleaga L, Torres F, Planas AM. URICO-ICTUS Investigators. Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:453–60.
41. Chacko BK, Wall SB, Kramer PA, Ravi S, Mitchell T, Johnson MS, Wilson L, Barnes S, Landar A, Darley-Usmar VM. Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils. *Redox Biol.* 2016;9:57–66.
42. Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376:333–7.

## ARTÍCULO Nº2

**T Cells Prevent Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke by P-Selectin Binding**

Angélica Salas-Perdomo, Francesc Miró-Mur, Xabier Urra, Carles Justicia, Mattia Gallizioli, Yashu Zhao, Vanessa H. Brait, Carlos Laredo, Raúl Tudela, Andrés Hidalgo, Ángel Chamorro Y Anna Planas.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Jun 14. pii: ATVBHA.118.311284. doi: 10.1161/ATVBHA.118.311284.

En este trabajo se ha estudiado el rol de los linfocitos T en la transformación hemorrágica en el ictus isquémico tras la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratones. Así mismo se ha investigado la interacción de las células T con las plaquetas, por medio de la vía P-selectina- PSGL1, usando ratones modificados genéticamente.

**Resumen:**

Antecedentes: la transformación hemorrágica es una complicación frecuente después de las terapias de recanalización del ictus isquémico y suele estar asociada a una peor recuperación funcional y al aumento de la mortalidad. Este artículo tiene como objetivo identificar algunos mecanismos involucrados en la transformación hemorrágica (TH) ocasionada por el accidente cerebrovascular isquémico por medio del estudio de la linfopenia y de la interacción plaqueta-linfocito en ratones.

Enfoque y resultados: se utilizaron ratones nativos, ratones modificados *Selp<sup>lg</sup><sup>-/-</sup>* y *Fut7<sup>-/-</sup>* que presentan una unión a P-selectina defectuosa y ratones *Rag2<sup>-/-</sup>* deficientes en linfocitos. Se indujo la isquemia cerebral por 30 o 45 minutos a través de la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media. Se evaluó la TH a las 48 horas tras reperusión por medio de un sistema macroscópico de calificación por puntuación, por histología, por contenido de hemoglobina en el cerebro o por resonancia magnética. También se depleccionaron las plaquetas y se hizo transferencia adoptiva de células T de los diferentes genotipos a los ratones deficientes en linfocitos. Se estudiaron las interacciones de los linfocitos T con las plaquetas por citometría de flujo y tecnología de imagen de flujo “imageStream”.

Se demostró que la deplección de las plaquetas aumenta el riesgo de sangrado solamente en los infartos más graves y que la linfopenia predispone a la TH tras un ictus grave, además también se observó que la transferencia adoptiva de linfocitos T puede prevenir la TH en los animales linfopénicos. Las células T memoria CD4<sup>+</sup> fueron el grupo de linfocitos que se unieron a las P-selectina y a las plaquetas a través del ligando P-selectina glicoproteína 1 (PSGL1). Los ratones con defectos en la unión de P-selectina tuvieron una mayor puntuación hemorrágica en comparación con los ratones nativos. La transferencia adoptiva de linfocitos defectuosos en la unión de P-selectina no previno la TH en los animales linfopénicos.

Conclusiones: este estudio identifica la linfopenia como un factor de riesgo, previamente no reconocido, de TH secundaria en ratones tras un ictus isquémico grave. Las células T previenen la TH gracias a su capacidad de unirse a las plaquetas a través de la P-selectina. Estos resultados destacan el rol de los linfocitos T como células puente entre la inmunidad y la hemostasia en el ictus isquémico.



## T Cells Prevent Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke by P-Selectin Binding

Angélica Salas-Perdomo, Francesc Miró-Mur, Xabier Urrea, Carles Justicia, Mattia Gallizioli, Yashu Zhao, Vanessa H. Brait, Carlos Laredo, Raúl Tudela, Andrés Hidalgo, Ángel Chamorro, Anna M. Planas

**Objective**—Hemorrhagic transformation is a serious complication of ischemic stroke after recanalization therapies. This study aims to identify mechanisms underlying hemorrhagic transformation after cerebral ischemia/reperfusion.

**Approach and Results**—We used wild-type mice and *Selplg<sup>-/-</sup>* and *Fut7<sup>-/-</sup>* mice defective in P-selectin binding and lymphopenic *Rag2<sup>-/-</sup>* mice. We induced 30-minute or 45-minute ischemia by intraluminal occlusion of the middle cerebral artery and assessed hemorrhagic transformation at 48 hours with a hemorrhage grading score, histological means, brain hemoglobin content, or magnetic resonance imaging. We depleted platelets and adoptively transferred T cells of the different genotypes to lymphopenic mice. Interactions of T cells with platelets in blood were studied by flow cytometry and image stream technology. We show that platelet depletion increased the bleeding risk only after large infarcts. Lymphopenia predisposed to hemorrhagic transformation after severe stroke, and adoptive transfer of T cells prevented hemorrhagic transformation in lymphopenic mice. CD4<sup>+</sup> memory T cells were the subset of T cells binding P-selectin and platelets through functional P-selectin glycoprotein ligand-1. Mice defective in P-selectin binding had a higher hemorrhagic score than wild-type mice. Adoptive transfer of T cells defective in P-selectin binding into lymphopenic mice did not prevent hemorrhagic transformation.

**Conclusions**—The study identifies lymphopenia as a previously unrecognized risk factor for secondary hemorrhagic transformation in mice after severe ischemic stroke. T cells prevent hemorrhagic transformation by their capacity to bind platelets through P-selectin. The results highlight the role of T cells in bridging immunity and hemostasis in ischemic stroke.

**Visual Overview**—An online [visual overview](#) is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:1761-1771. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311284.)

**Key Words:** blood platelets ■ brain ■ hemorrhage ■ ischemia ■ lymphocytes ■ mice

Remarkable progress has been made in recent years in the treatment of acute ischemic stroke with the wider implementation of systemic and endovascular reperfusion therapies.<sup>1</sup> However, some patients may remain functionally dependent or die despite these interventions as the result of complications. Hemorrhagic transformation (HT), or bleeding into an area of ischemic brain, ranges from small petechiae to large parenchymal hematomas.<sup>2</sup> HT occurs in ≈12% of patients with ischemic stroke,<sup>3</sup> but the risk increases to 26% after revascularization therapies.<sup>4</sup> HT is considered clinically relevant when it becomes symptomatic (symptomatic intracerebral hemorrhage [sICH]), which occurs in ≈3% of patients receiving systemic thrombolysis<sup>5</sup> and 5% of patients treated with combined intravenous and intra-arterial therapy.<sup>4</sup> The overall rate of sICH after mechanical thrombectomy is 4.4%,<sup>6</sup> but it may increase up to 11.3% when multiple device passes are required to achieve

recanalization.<sup>7</sup> Several clinical features, blood markers, genetic factors, and neuroimaging findings have been associated with HT in patients with ischemic stroke.<sup>8,9</sup> HT is more frequent after large infarctions,<sup>3,5,8-10</sup> and critical determinants are severe damage of the vascular endothelium and the blood-brain barrier.<sup>8,11,12</sup> Yet, better understanding of the mechanisms underlying HT is of utmost clinical relevance because it may lead to identifying more sensitive predictors and new therapeutic strategies to minimize the burden of this serious complication.

Recent studies suggested that the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) predicted an increased risk of sICH after thrombolytic therapy in patients with stroke.<sup>13</sup> However, it is currently unknown whether there is a causal association between neutrophils, NLR, and the hemorrhagic risk or, alternatively, whether changes in white blood cells follow the severity of stroke, or concurrent complications. Acute stroke induces lymphopenia by

Received on: March 4, 2018; final version accepted on: May 29, 2018.

From the Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain (A.S.-P., C.J., M.G., A.M.P.); Functional Unit of Cerebrovascular Diseases, Hospital Clínic, Barcelona, Spain (F.M.-M., X.U., Á.C.); Area of Neuroscience, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain (F.M.-M., X.U., C.J., M.G., Y.Z., V.H.B., C.L., Á.C., A.M.P.); Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Biomedical Imaging Group, Barcelona, Spain (R.T.); Area of Cell and Developmental Biology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain (A.H.); and Institute for Cardiovascular Prevention (IPEK), Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany (A.H.).

Current address for V.H. Brait: The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/journal/atvb/doi/suppl/10.1161/atvbaha.118.311284>.

Correspondence to Anna M. Planas, PhD, IIBB-CSIC, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Rosselló 161, Planta 6, 08036-Barcelona, Spain. E-mail [anna.planas@iibb.csic.es](mailto:anna.planas@iibb.csic.es)

© 2018 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <https://www.ahajournals.org/journal/atvb>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311284



Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
<b>Fut 7</b>	fucosyltransferase 7
<b>HT</b>	hemorrhagic transformation
<b>MCAo</b>	middle cerebral artery occlusion
<b>NLR</b>	neutrophil to lymphocyte ratio
<b>PSGL-1</b>	P-selectin glycoprotein ligand-1
<b>tPA</b>	tissue-type plasminogen activator

mechanisms involving complex neurohormonal responses.<sup>14–17</sup> However, there is no information on whether stroke-induced lymphopenia increases the hemorrhagic risk.

Leukocytes interact with platelets<sup>18</sup> through several mechanisms, such as platelet P-selectin binding to PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1 or CD162), which is expressed in neutrophils and T cells, but not B cells.<sup>19–21</sup> Functional P-selectin binding epitopes in the PSGL-1 molecule require post-translational modifications involving protein glycosylation mediated by various glycosyltransferases, including Fut7 (fucosyltransferase 7).<sup>22</sup> Expression of Fut7 in T lymphocytes is inducible on activation and polarization of naive T cells, and it is required for T-cell migration into inflamed tissues.<sup>22–24</sup> T cells exacerbate brain damage after cerebral ischemia/reperfusion because they facilitate platelet and leukocyte adhesion to the vessel wall and promote thromboinflammation.<sup>25,26</sup>

In our study, postischemic lymphopenia facilitated HT. We used Rag2<sup>-/-</sup> mice, which show severe lymphopenia because of lack of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells, B cells, and NKT (natural killer T cells) cells. These mice were prone to HT after severe ischemic stroke unless they were reconstituted with T cells. This study identified a new mechanism mediated by the PSGL-1/P-selectin axis by which T cells and platelets prevent secondary HT after severe brain ischemia/reperfusion in mice.

## Materials and Methods

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request. An extended version of this section is available in the [online-only Data Supplement](#).

### Animals

We used adult (10–16 weeks) male mice on the C57BL/6J background (n=584). Mice included Rag2<sup>-/-</sup> mice (B6(Cg)-Rag2<sup>tm1.1Cgn</sup>/J, no. SN 008449, The Jackson Laboratory) wild-type mice (no. SN 000664, Jaxmice), PSGL-1-deficient (*Selp*g<sup>-/-</sup>) mice, and Fut7<sup>-/-</sup> mice.<sup>27,28</sup> Animal work was conducted following the local and the European regulations. The ethical committee of the University of Barcelona (CEEA [Comité Ètic d'Experimentació Animal]) approved the experimental procedures. Experimental animal work is reported in compliance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines.

### Brain Ischemia

Occlusion of the right middle cerebral artery (MCAo) was performed under isoflurane anesthesia using a monofilament (no. 701912PK5Re, Doccol Corporation, Sharon, MA), as described.<sup>29</sup> Two days post-ischemia, we assessed the neurological dysfunction with a neurological score modified from a previously reported neuroscore.<sup>30</sup>

### Drug Treatments

Treatment was randomly allocated and was administered in a blinded fashion. Ten minutes after reperfusion, mice received an intraperitoneal

injection of rabbit anti-mouse platelet serum (15  $\mu$ L diluted in saline to 200  $\mu$ L; no. CLA31440, Cederlane) or the vehicle (saline).

### Evaluation of HT

At 48 hours of reperfusion, mice were anesthetized with isoflurane and perfused through the heart with heparinized saline. The severity of brain hemorrhage was assessed in coronal brain sections (1-mm thick) of fresh tissue by giving scores (0–5, where 0 means absence of hemorrhage and 5 means large hematomas)<sup>31</sup> and with histological measures.

### Magnetic Resonance Imaging

The mouse brain was studied with magnetic resonance imaging (7T, BioSpec, Bruker) using ParaVision 6.0 software. Infarct volume was measured on images obtained with T2\*-weighted turboRARE fast spin-echo.<sup>29</sup> Cerebral blood flow was measured with a pulsed arterial spin labeling method. For assessment of brain bleeds, mice received a T2\*-weighted magnetic resonance imaging scan using a gradient-echo pulse sequence.

### Immunofluorescence

Mice were perfused through the heart with heparinized saline followed by 4% paraformaldehyde, and the brain was processed to obtain cryostat sections for immunofluorescence. Primary antibodies were rabbit polyclonal antibodies against pan-laminin or Glut-1 (facilitated glucose transporter, member 1) and rat monoclonal antibodies against CD41. Please see the Major Resources Table in the [online-only Data Supplement](#). Images were obtained on a confocal microscope (TCS SPE-II, Leica Microsystems) with LAS software (Leica).

### Isolation and Administration of T Cells for Adoptive Transfer

T cells were isolated from the spleen and the cervical and inguinal lymph nodes of donor mice through negative selection (Pan T-cell isolation kit-II mouse, no. 130-095-130, Miltenyi Biotech). Dead cells were removed (Dead cell removal kit, no. 130-090-101, Miltenyi Biotech), and viable T cells (15–20 $\times$ 10<sup>6</sup> cells) were administered intravenously to Rag2<sup>-/-</sup> mice the day before MCAo. Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving adoptive transfer of T cells were compared with littermate Rag2<sup>-/-</sup> mice that did not receive cell administration.

### Quantification of Brain Hemoglobin Content

Brain hemoglobin content was determined with a colorimetric assay (no. 700540, Cayman Chemicals).

### Blood Cell Counts

Blood was collected from the vena cava in EDTA and was analyzed in a hematology system (ADVIA2120i, Siemens).

### Flow Cytometry

Cell isolation from brain tissue was performed as described.<sup>32</sup> Cells were incubated at 4°C for 10 minutes with FcBlock followed by primary antibodies. See the Major Resources Table in the [online-only Data Supplement](#). Aqua (live/death, Molecular Probes) was used to gate on live cells. Brain cells and blood were studied in a BD FACSLSRII cytometer using the FACS Diva software (BD Biosciences). Data analysis was performed with FlowJo software (v10 FlowJo, LLC). P-selectin binding assay was performed using chimeric P-selectin/hlgM (human immunoglobulin M). Dynamic interactions of T cells with platelets were studied in diluted fresh whole blood, and cell conjugates were visualized with ImageStream MARKII technology (Amnis, EMD Millipore).

### Platelet and T-Cell Conjugate Analysis

Diluted whole blood was prepared as described.<sup>33</sup> Briefly, 50  $\mu$ L of blood was diluted in 200  $\mu$ L of Tris-buffered saline containing 20 U/mL



of heparin. One milliliter of Tyrode's buffer supplemented with 1.25 mmol/L of  $\text{CaCl}_2$  was added. Fifty microliter were incubated for 20 minutes with a mixture of antibodies. See the Major Resources Table in the online-only Data Supplement. Samples were immediately analyzed in a BD-FACS LSRII flow cytometer. For P-selectin binding assay,  $10^6$  leukocytes were incubated with a mix of antibodies for 15 minutes at  $6^\circ\text{C}$  and then with anti-hlgM fluorescein isothiocyanate for 15 minutes at  $6^\circ\text{C}$ . Cells were analyzed as above. For Amnis ImageStream analysis, whole diluted blood was stained with antibodies for 20 minutes at room temperature, red blood cells were lysed for 10 minutes at room temperature, and washed with Tyrode's buffer. Data were collected with INSPIRE software (EMD-Milipore) and was analyzed with IDEAS software (EMD-Milipore) using the wizard composite for CD3 and CD41 to generate images of platelet-T cell conjugates.

### Statistics

The statistical tests used in each experiment and n values are reported in the Figure legends.

## Results

### Platelet Depletion Increases the Hemorrhagic Risk Only in Large Infarcts

Reperfusion therapies are not recommended in ischemic stroke patients with low platelet counts because of a high risk of HT.<sup>34</sup> Antiplatelet drugs also increase the risk of HT after reperfusion therapies, particularly in patients with large infarctions.<sup>9</sup> To find out the contribution of platelets in preventing hemorrhage secondary to brain ischemia, we treated mice with an antiplatelet serum that markedly reduced platelet numbers (Figure 1A). We induced different degrees of ischemic brain damage by MCAo for either 30 or 45 minutes. Forty-five-minute MCAo induced larger infarct volumes, as expected, and caused HT in some mice while HT was infrequent after 30-minute MCAo (Figure I in the online-only Data Supplement). Platelet depletion after induction of ischemia (Figure 1B) did not significantly increase brain bleeding after 30-minute MCAo while it produced large hematomas after 45-minute MCAo (Figure 1C and 1D). After 45-minute ischemia, we detected the presence of platelets in the ischemic brain tissue in different locations (Figure 1E), that is, intravascular platelets blocking the lumen of some capillaries, platelets within parenchymal hemorrhages, or platelet clusters surrounding the abluminal side of the endothelium. Platelets surrounded blood vessels in zones with extravasated fibrin(ogen; Figure 1E), suggesting the formation of extravascular hemostatic clots sealing the ruptured vessels.

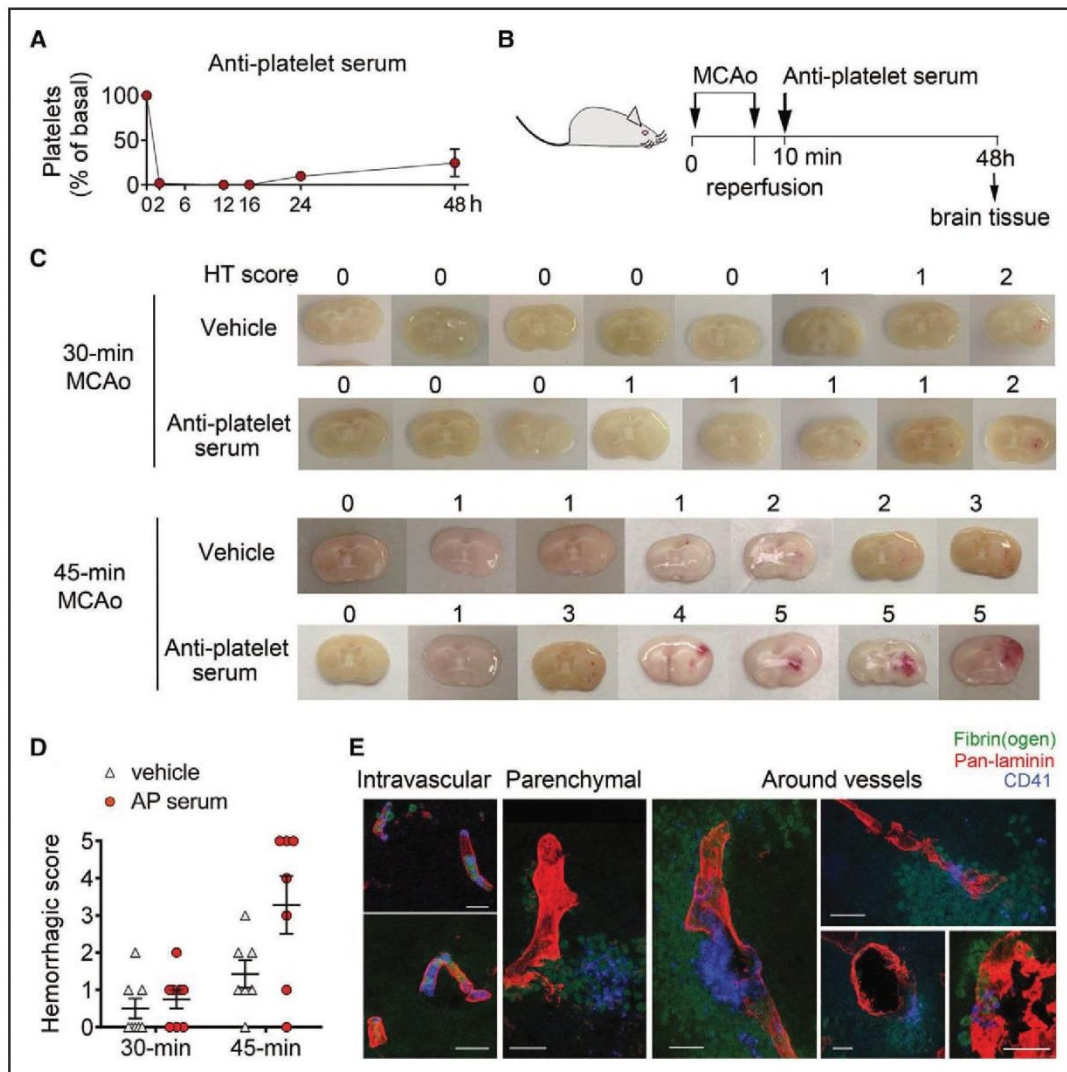
### Involvement of NLR, Neutrophils, and Lymphocytes in HT

A high NLR is associated with HT in patients with ischemic stroke treated with thrombolysis.<sup>13</sup> We measured blood cell counts 48 hours after 45-minute ischemia to assess for the contribution of blood cells in HT in our stroke mouse models. Neutrophils tended to increase after ischemia, whereas lymphocyte numbers markedly decreased, in agreement with the reported stroke-induced lymphopenia,<sup>14-17</sup> and the NLR as well as platelet numbers increased (Figure 2A). Infarct size was positively correlated to the hemorrhagic score (Figure 2B). Accordingly, examining infarct size in each category of HT score (Figure 2C) showed that mice with hemorrhages had

larger infarctions and worse neurological deficits than mice devoid of bleeding (HT score=0) or with a few small petechiae (HT score=1; Figure 2D and 2E). Nonetheless, the mice with the highest hemorrhagic scores did not show the largest infarctions (Figure 2D), suggesting that the magnitude of bleeding might be influenced by other factors in addition to infarct size. We then examined blood cell counts in relation to the degree of hemorrhage. We did not find apparent relationships between the degree of hemorrhage and neutrophil numbers or the NLR (Figure 2F and 2G). However, the most noticeable finding was that mice with the highest hemorrhagic scores showed lower lymphocyte counts (Figure 2H), and lymphocyte counts were inversely correlated with the HT score (Figure 2I). To account for infarct size and lymphocyte counts, we calculated the volume-to-lymphocyte ratio by dividing infarct size (% of hemispheric volume) by blood lymphocyte number (cells/nL). The volume-to-lymphocyte ratio progressively increased with increasing hemorrhagic score (Figure 2J). These results suggest that the highest risk of bleeding occurs in large infarcts with the lowest lymphocyte counts.

### Low T-Cell Numbers Increase HT After Severe Ischemia

Lymphopenic  $\text{Rag}^{-/-}$  mice offer an experimental model to investigate whether low lymphocyte counts might be involved in HT. However, evidence shows that  $\text{Rag}^{-/-}$  mice develop smaller lesions than the wild-type mice after transient ischemia,<sup>25,26</sup> stressing that it is necessary to account for the extent of the infarct to address the relationship between lymphocytes and the risk of HT.  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice showed smaller infarct volumes than the wild-type mice after 30-minute ischemia (Figure II in the online-only Data Supplement). However, infarct volumes were similar in wild-type mice and  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice after 45-minute ischemia, and we did not detect differences in cerebral blood flow recovery after MCAo between genotypes (Figure II in the online-only Data Supplement). Nonetheless, after 45-minute ischemia, the  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice seemed to bleed more, as assessed macroscopically in the tissue sections (Figure 3A) and microscopically in paraffin sections (Figure 3B). To find out whether this effect was attributable to the lack of T cells, we performed adoptive transfer of T cells to  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice the day before ischemia (see Figure III in the online-only Data Supplement for viability and purity of injected T cells). Forty-eight hours after 45-minute MCAo, the lymphocyte counts  $\times 10^3$  (mean  $\pm$  SD, n) were  $0.830 \pm 0.386$  (ranging from 0.170 to 1.670; n=26) in wild-type mice;  $0.132 \pm 0.094$  (ranging from 0.030 to 0.420; n=23) in  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice; and  $0.279 \pm 0.204$  (ranging from 0.070 to 0.880; n=13) in  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice that had received adoptive transfer of T cells. The increase of T cells after adoptive transfer was statistically significant (Mann-Whitney test,  $P=0.003$ ). Notably, adoptive transfer of T cells lowered the HT score in  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice (Figure 3C; Figure IV in the online-only Data Supplement). We also quantified the brain hemoglobin content and performed T2\*-weighted magnetic resonance imaging (Figure 3D and 3E). In all these measurements, adoptive transfer of T cells to the  $\text{Rag}2^{-/-}$  mice consistently reduced the signs of secondary hemorrhage. In independent



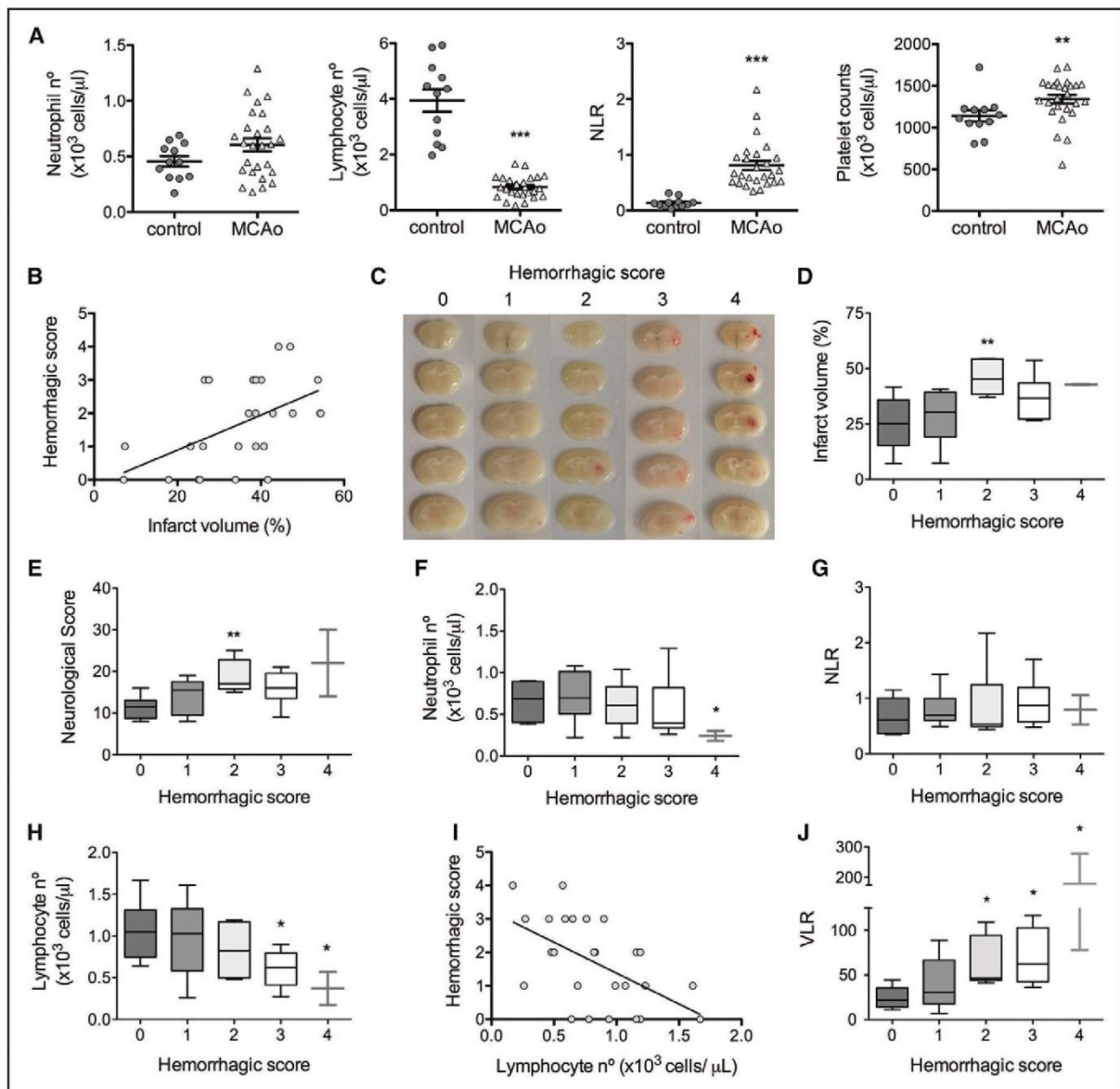
**Figure 1.** Platelet depletion increases brain bleeding after severe ischemia but not mild ischemia. **A**, Time course of circulating platelets after antiplatelet (AP) serum administration to control mice (n=3) to verify thrombocytopenia. **B**, Mice received antiplatelet serum or the vehicle (saline) intraperitoneally 10 min after reperfusion (reperf.) after 30-min (n=8 mice per group) or 45-min (n=7 mice per group) middle cerebral artery occlusion (MCAo). **C** and **D**, Fresh brain tissue sections were obtained at 48 h to assess for the presence of blood in the infarcted tissue. One section of each mouse is shown for illustrative purposes. Hemorrhagic transformation (HT) was assessed assigning a hemorrhagic score ranging from 0 (no hemorrhage) to 5 (large parenchymal hematoma). Platelet depletion did not significantly increase bleeding after 30-min MCAo (Mann-Whitney test,  $P=0.567$ ). After 45-min MCAo, the hemorrhagic score tended to be higher in the platelet-depleted group (Mann-Whitney,  $P=0.092$ ), but 1 mouse of each group did not bleed at all. However, within the mice showing some degree of blood in the brain tissue (n=6 per group), the hemorrhagic score was significantly higher in the platelet-depleted group (Mann-Whitney test,  $*P=0.035$ ). **E**, After 45-min ischemia, platelets (CD41<sup>+</sup>, blue) are seen in the brain tissue in the vessel lumen (Intravascular), free in the brain parenchyma (parenchymal), and as clusters surrounding the vasculature (around vessels). Images are representative of 5 mice. Pan-laminin (red) shows the vessel basal lamina, and fibrin(ogen; green) shows vascular leakage. Scale bar, 15  $\mu$ m.

groups of mice, we tested whether administration of T cells to Rag2<sup>-/-</sup> mice affected the size of the brain lesion and the neurological deficit. T cells increased infarct volume after 30-minute MCAo but not after 45-minute MCAo (Figure 4). However, in the latter severe ischemia model, adoptive transfer of T cells reduced the hemorrhagic score and attenuated the neurological deficits (Figure 4). Altogether, these results showed that T cells prevented HT after ischemic stroke in mice with marked lymphopenia.

### Crosstalk of T Cells and Platelets

Platelets support interaction of platelet-binding T cells to the vessel wall,<sup>18</sup> and T cells facilitate adhesion of leukocytes and platelets to the vascular endothelium after cerebral ischemia/reperfusion.<sup>25</sup> We found fewer platelet clusters around blood vessels of the ischemic tissue of Rag2<sup>-/-</sup> mice compared with wild-type mice but not after adoptive transfer of T cells (Figure 5A). The effect was not because of low platelet counts in these mice (mean $\pm$ SD platelet number $\times 10^3$ , wild-type

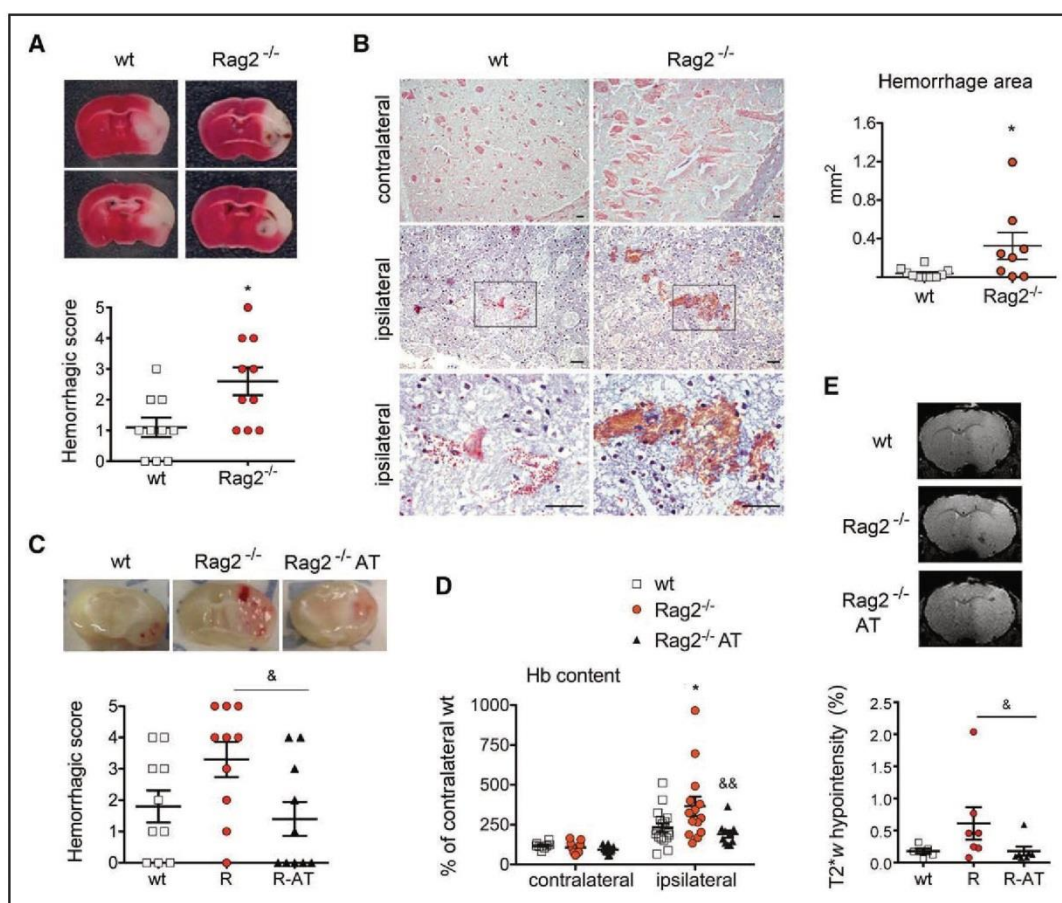




**Figure 2.** Low lymphocyte counts are associated with hemorrhagic transformation. Results of blood counts for control mice ( $n=12$ ) and ischemic mice 48 h after 45-min middle cerebral artery occlusion (MCAo;  $n=26$ ). **A**, After ischemia, neutrophils tended to increase (unpaired  $t$  test with Welch correction,  $P=0.053$ ), lymphocyte numbers strongly decreased ( $***P<0.001$ ), the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) increased ( $***P<0.001$ ), and platelet numbers increased ( $**P=0.006$ ; Mann-Whitney tests). **B**, The hemorrhagic score was positively correlated with infarct volume (Spearman  $r=0.541$ ;  $P=0.004$ ;  $n=26$ ). **C**, We grouped ischemic mice ( $n=26$ ) according to their hemorrhagic score, as illustrated with representative brain tissue sections. There were  $n=6$  mice in each score category, excepting for score=4 with  $n=2$  mice. **D**, Infarct volume was larger for mice showing bleeds (Kruskal-Wallis test  $P=0.017$ ; Dunn test  $**P<0.01$  vs score=0). **E**, Similar results were found for the neurological score (Kruskal-Wallis test  $P=0.078$ ; Dunn test  $**P<0.01$  vs score=0). **F** and **G**, Neutrophils and the NLR showed no apparent changes between hemorrhagic score categories (Kruskal-Wallis test  $P=0.238$ ), but mice with hemorrhagic score=4 had low neutrophils (Dunn test,  $P<0.05$  vs score=0). **H**, Lymphocytes tended to decrease progressively for higher hemorrhagic scores (Kruskal-Wallis test  $P=0.080$ ; Dunn test  $*P<0.05$  vs score=0). **I**, The hemorrhagic score was inversely correlated with lymphocyte number (Spearman  $r=-0.554$ ;  $P=0.003$ ;  $n=26$ ). **J**, To account for infarct size and lymphocyte number, we calculated for each mouse the volume-to-lymphocyte ratio (VLR) as the ratio between infarct volume and the number of blood lymphocytes (cell counts/nL). VLR increased with increasing hemorrhagic score (Kruskal-Wallis test  $P=0.011$ ; Dunn test  $*P<0.05$  vs score=0). **A**, **B**, and **I**, Values for each mouse, and (**D**–**H**, **J**) represent group values as box and whiskers from min to max.

mice:  $1240\pm 205$ ,  $n=8$ ; Rag2<sup>-/-</sup> mice:  $1430\pm 296$ ,  $n=7$ ). We detected T cells within zones of platelet accumulations in the infarcted brain tissue of wild-type mice (Figure 5B) and hypothesized that an interaction of T cells with platelets might

be involved in preventing HT after ischemic stroke. Specific subsets of T cells form conjugates with platelets in blood.<sup>21</sup> Accordingly, flow cytometry of blood showed  $\approx 5\%$  to  $10\%$  of T cells positive for CD41 (Figure VA in the online-only



**Figure 3.** Adoptive transfer of T cells prevents hemorrhagic transformation after severe ischemia in lymphopenic mice. Results were obtained 48 h after 45-min middle cerebral artery occlusion (MCAO). **A**, Representative 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride brain sections illustrate the higher hemorrhagic scores in lymphopenic Rag2<sup>-/-</sup> mice than wild-type (wt) mice (n=10 per group) (Mann-Whitney test, \**P*=0.021). **B**, Carstairs histological brain sections. **Bottom**, Magnifications of **(middle)**. Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=8) show larger hemorrhagic areas than wt mice (n=9; Mann-Whitney test, \**P*=0.026). **C**, Hemorrhage in fresh brain sections of independent groups of wt mice, Rag2<sup>-/-</sup> mice (R), and littermate Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving adoptive transfer (AT) of T cells (R-AT) (n=10 per group). AT of T cells reduced the hemorrhagic score in Rag2<sup>-/-</sup> mice (Kruskal-Wallis test, *P*=0.045; Dunn test, &*P*<0.05; extended data and validation are shown in Figure IV in the online-only Data Supplement). **D**, Brain hemoglobin (Hb) content (ELISA assay) was higher in the ipsilateral hemisphere of Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=14) than wt mice (n=17) but not after AT of T cells (n=10; 2-way ANOVA by group, *P*=0.047; and hemisphere, *P*<0.001; and Bonferroni test \**P*<0.05 vs wt mice; &&*P*<0.01 vs Rag2<sup>-/-</sup> mice). **E**, T2<sup>w</sup>-weighted magnetic resonance imaging (MRI) in wt mice (n=5), Rag2<sup>-/-</sup> mice (R) (n=7), and Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving T cells (R-AT) (n=7) shows reduced hypointensity volumes (% of hemispheric volume) in the ischemic hemisphere of Rag2<sup>-/-</sup> mice after AT of T cells (Kruskal-Wallis test *P*=0.094; Dunn test, &*P*<0.05 vs R). The corresponding MRI infarct volume (T2 maps) did not differ between wt mice (35.7%±9.4%), Rag2<sup>-/-</sup> mice (38.1%±7.6%), and Rag2<sup>-/-</sup> mice with T-cell AT (36.4%±12.4%). Scale bar, 50 μm.

Data Supplement), suggesting binding of activated platelets to a subset of T cells. Image stream technology combining high-resolution microscopy with flow cytometry confirmed the presence of circulating T cell-platelet conjugates (Figure 5C).

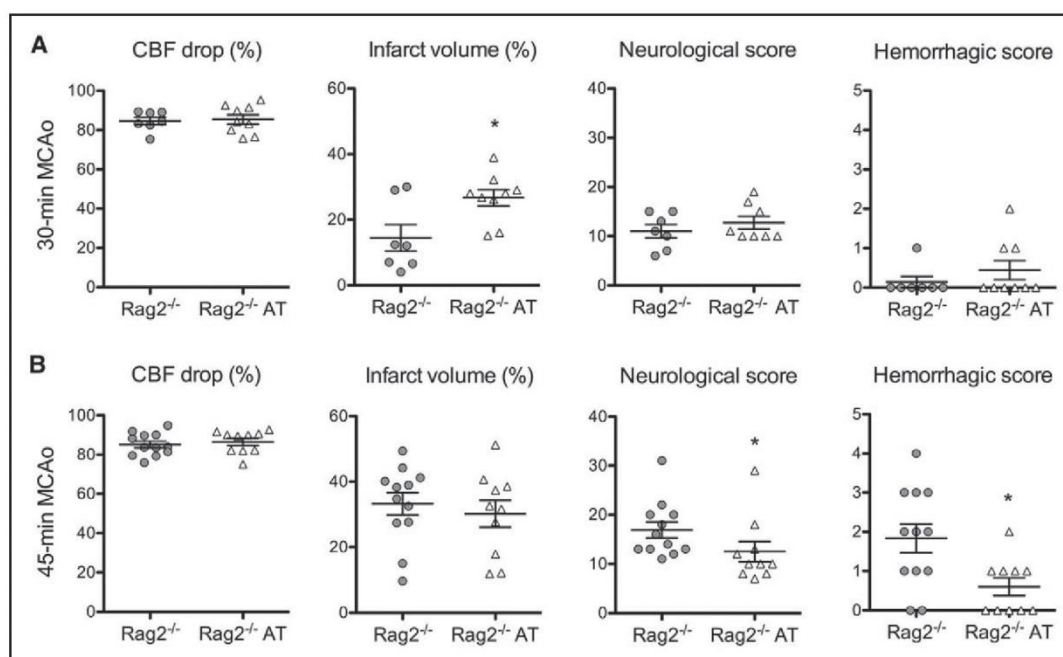
Although the majority of blood T cells are CD162<sup>+</sup>, only a subset of them showed binding of a soluble P-selectin chimera (Figure VB in the online-only Data Supplement) and formed platelet conjugates (Figure VC in the online-only Data Supplement). Accordingly, CD4<sup>+</sup> memory T cells of wild-type mice bound soluble P-selectin, whereas naïve T cells did not, and memory T cells deficient in *Fut7* were unable to bind soluble P-selectin (Figure VIA in the online-only Data Supplement). Likewise, platelets mainly bound CD4<sup>+</sup> memory T cells (Figure VIB in the online-only Data Supplement),

whereas *Fut7*<sup>-/-</sup> or PSGL-1-deficient (*Selplg*<sup>-/-</sup>) memory T cells unable to bind P-selectin showed less platelet-T cell conjugates than the wild-type T cells (Figure 5D).

### Active P-Selectin Binding Sites in T Cells Are Required to Prevent HT After Severe Ischemic Stroke

In vivo, PSGL-1-deficient mice (*Selplg*<sup>-/-</sup> mice) showed a higher hemorrhagic score than wild-type mice after 45-minute ischemia (Figure 6A), suggesting that P-selectin binding was necessary to protect large infarcts from HT. To find out whether active P-selectin binding sites in T cells were involved in this effect, Rag2<sup>-/-</sup> mice received adoptive transfer of T cells obtained from either wild-type mice, *Selplg*<sup>-/-</sup> mice, or *Fut7*<sup>-/-</sup> mice. *Selplg*<sup>-/-</sup> and *Fut7*<sup>-/-</sup> T cells did not prevent





**Figure 4.** Effect of adoptive transfer of T cells on the outcome of brain ischemia. **A** and **B**,  $Rag2^{-/-}$  mice received adoptive transfer (AT) of T cells the day before ischemia ( $Rag2^{-/-}$  AT) or were untreated ( $Rag2^{-/-}$ ). Mice were subjected to either 30-min or 45-min middle cerebral artery occlusion (MCAo) and were studied at 48 h. The drop in cerebral blood flow (CBF) induced by MCAo was similar in all groups. **A**, After 30-min ischemia, the mice that received T cells ( $n=9$ ) showed a larger infarct volume (%) than the mice that did not ( $n=7$ ;  $t$  test,  $*P=0.017$ ), but the differences in the neurological score were not statistically significant (Mann-Whitney test,  $P=0.186$ ), and the hemorrhagic score did not change (Mann-Whitney test,  $P=0.402$ ). **B**, After 45-min ischemia, the  $Rag2^{-/-}$  mice with AT of T cells ( $n=10$ ) showed an infarct volume similar to that of untreated  $Rag2^{-/-}$  mice ( $n=12$ ;  $t$  test,  $P=0.564$ ). However, treatment with T cells improved the neurological score (Mann-Whitney test,  $*P=0.017$ ) and reduced the hemorrhagic score (Mann-Whitney test,  $*P=0.020$ ).

HT after severe ischemia, in contrast to the effect of wild-type T cells (Figure 6B; Figure VII in the [online-only Data Supplement](#)). These results demonstrate that P-selectin binding through functional PSGL-1 confers T cells the property to prevent HT after severe ischemia. Given that the subset of T cells with P-selectin-binding capacity are the memory T cells, our result suggests that memory T cells induce prohemostatic effects in large cerebral infarctions at risk of bleeding.

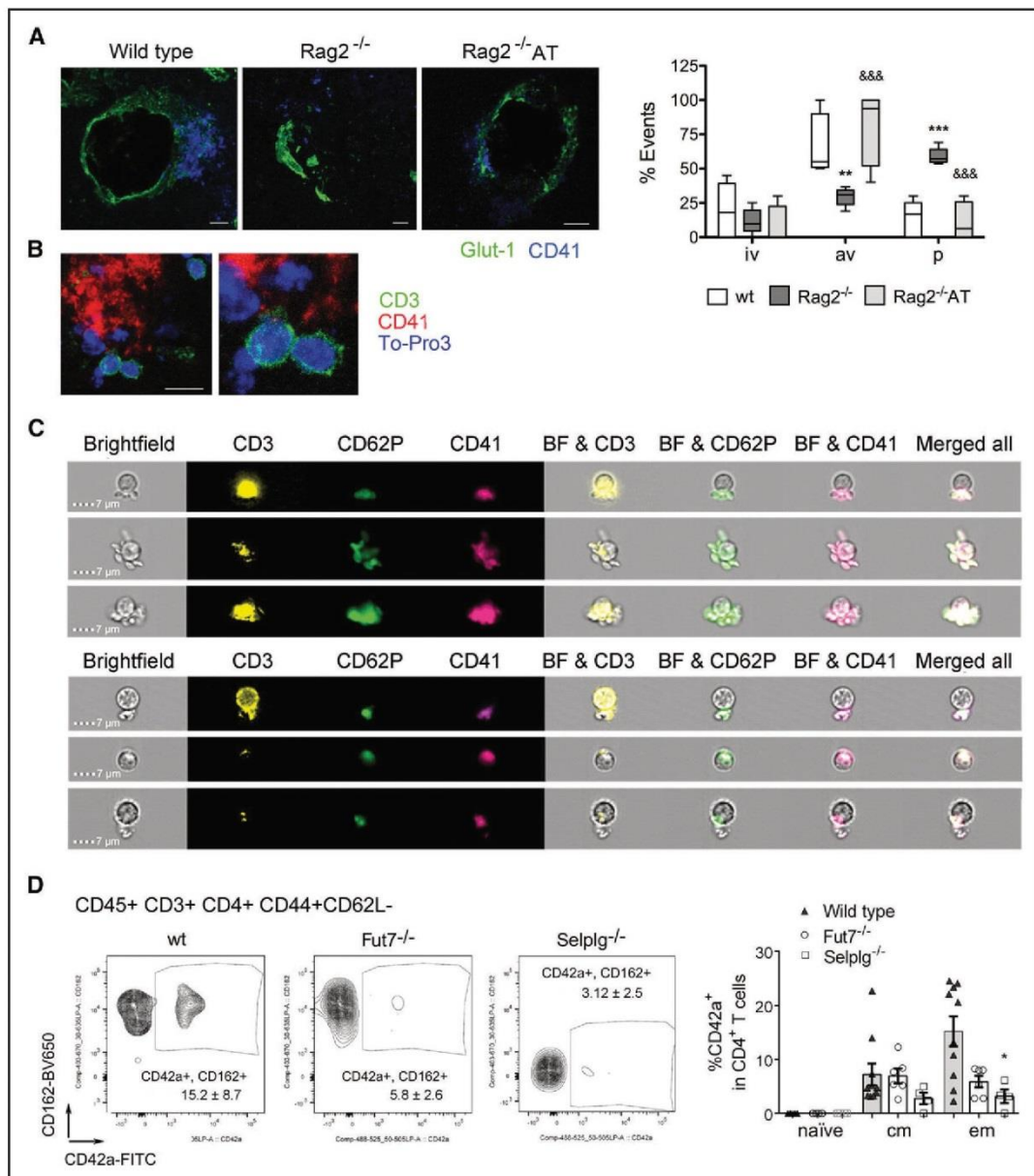
### Discussion

The current best treatment for ischemic stroke is reperfusion therapy with thrombolysis or mechanical thrombectomy in suitable patients. However, the benefits of these therapies may be hindered by complications, such as HT. HT occurs more frequently in patients with large infarctions,<sup>3,5,9</sup> but little is known about the underlying mechanisms. This study demonstrates that T cells reduce the risk of HT. It also confirms the relevance of infarct size as a critical factor that increases the hemorrhagic risk. Altogether, these results highlight the crosstalk between T cells and platelets bridging immunity and hemostasis to prevent HT after acute ischemic stroke.

Growing evidence supports the fact that platelets may contribute to the endothelial barrier function by providing physical coverage to the damaged endothelium and thus prevent vascular leakage at sites of severe endothelial injury.<sup>35-37</sup> Hence, our results support that platelets sealed the damaged vessels and reduced the leakage of blood to the ischemic brain parenchyma. This phenomenon was in part mediated by lymphocytes, given

that lymphopenia favored HT in large infarctions but did not influence this risk of HT after small infarctions. Functional binding sites on PSGL-1 in T cells were necessary to prevent HT after severe ischemia. PSGL-1 interacts with selectins and is involved in leukocyte adhesion to the activated endothelium and platelets.<sup>38,39</sup> Lymphocytes and platelets interact through a complex crosstalk with functional consequences for both cell types.<sup>18</sup> Memory  $CD4^{+}$  T cells are the circulating T cells that form conjugates with platelets. Platelet conjugation selectively enhances the adhesion of memory T cells to the endothelium of inflamed venules.<sup>39</sup> This phenomenon might underlie the recognized role of T cells in promoting thromboinflammation and worsening brain damage after ischemia/reperfusion.<sup>25,26</sup> However, platelets also support P-selectin-mediated adhesion of lymphocytes to the arterial wall when blood flow is disturbed<sup>40</sup> and after exposure of subendothelial matrix proteins that can occur at arterial sites of injury.<sup>41</sup> Our study suggests that memory T cells facilitate the formation of platelet plugs in the abluminal side of severely injured vessels. We found that the mechanism involves the PSGL-1/P-selectin axis, but identification of the precise molecular and cellular determinants of T cell-mediated platelet aggregation around the injured vessels will require more investigation.

The results highlight the intimate crosstalk between platelets and lymphocytes and their double role in hemostasis and inflammation, which in the context of cerebral ischemia can bear predominantly negative (thrombo-inflammatory) or positive (hemostatic) effects, likely depending on the vascular bed,

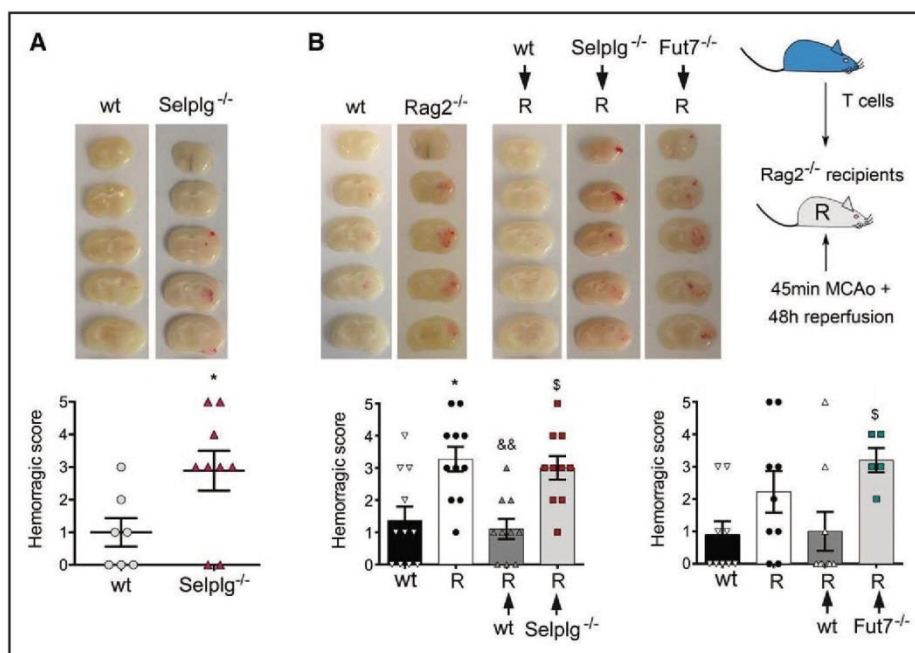


**Figure 5.** Platelets in the ischemic brain tissue and platelet-T-cell conjugates in blood. **A**, Platelets (CD41<sup>+</sup>, blue) and vascular endothelial cells (Glut-1<sup>+</sup> [facilitated glucose transporter, member 1], green) in the ischemic brain tissue 48 h after 45-min middle cerebral artery occlusion representative of wild-type mice (n=5), Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=5), and Rag2<sup>-/-</sup> receiving adoptive transfer of T cells (Rag2<sup>-/-</sup>AT; n=4). Assessment of platelet distribution in the tissue shows less platelet clusters around blood vessels and more platelet groups in the parenchyma of Rag2<sup>-/-</sup> mice. Adoptive transfer of T cells to Rag2<sup>-/-</sup> mice prevents these effects. Values are the % of events in each location are the average of measures obtained by 2 independent observers. Two-way ANOVA by animal group and platelet location followed by the Bonferroni test (\*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.01 vs wild-type [wt] mice, &&&*P*<0.001 vs Rag2<sup>-/-</sup> mice). **B**, CD3<sup>+</sup> T cells (green) are seen in the ischemic tissue near zones of CD41<sup>+</sup> platelet aggregation (red). Nuclei are stained with To-Pro3 (blue). Scale bar, 10 μm. **C**, ImageStream analysis (Amnis) in whole fresh blood (n=4 control wild-type mice) allows direct visualization of platelets (CD41<sup>+</sup>, CD42a<sup>+</sup>) and activated platelets (CD62P<sup>+</sup>) bound to T cells. **D**, Plots show CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> effector memory T cells and illustrate reduced conjugates of platelets and CD4<sup>+</sup> effector memory T cells in blood obtained from mice deficient in Fut7<sup>-/-</sup> (n=6) or P-selectin glycoprotein ligand 1; Selplg<sup>-/-</sup> (n=4) vs the blood of wt mice (n=10). The graph shows the results of platelet binding to naïve, central memory (cm), and effector memory (em) CD4<sup>+</sup> T cells. For effector memory T cells, Kruskal-Wallis test *P*=0.024, Dunn test \**P*<0.05 vs wt cells. For central memory T cells, Kruskal-Wallis test *P*=0.09. Values in the plots and the bar graphs are the mean±SEM of the number of mice indicated above, and the value for each individual mouse is shown in the graphs. av indicates around the abluminal side of vessels; iv, intravascular; and p, parenchyma.

the integrity of the vessels, and the risk of HT. T-cell prohemostatic effects prevail in large infarctions at risk of experiencing HT. In contrast, detrimental effects of T cells become apparent

in infarctions of mild or moderate size bearing a low risk of HT. This study identifies lymphopenia as a risk factor for HT of large infarctions, raising the question of whether T-cell





**Figure 6.** T cells unable to bind P-selectin do not prevent hemorrhagic transformation after severe ischemia. **A**, Images show fresh tissue sections representative of wild-type (wt) mice (n=7) and PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)-deficient (Selplg<sup>-/-</sup>) mice (n=9) 48 h after 45-min middle cerebral artery occlusion (MCAo). Each column corresponds to a different mouse. Selplg<sup>-/-</sup> mice showed a higher hemorrhagic score than the wt mice (Mann-Whitney test, \**P*=0.049). **B**, The 45-min MCAo was induced in wt mice and Rag2<sup>-/-</sup> mice (R) that were untreated or received adoptive transfer (AT) of wt T cells, Selplg<sup>-/-</sup> T cells, or Fut7<sup>-/-</sup> T cells. Hemorrhage was assessed at 48 h of reperfusion, and representative images of fresh tissue sections per group are shown (see extended data in Figure VII in the online-only Data Supplement). We first compared wt mice (n=11), untreated Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=11) and Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving wt T cells (n=10) or Selplg<sup>-/-</sup> T cells (n=10). Wt T cells reduced the hemorrhagic score, but Selplg<sup>-/-</sup> T cells did not (Kruskal-Wallis test, *P*=0.001; and Dunn test \**P*<0.05 vs wt; &&*P*<0.01 vs untreated Rag2<sup>-/-</sup> mice; \$*P*<0.05 vs Rag2<sup>-/-</sup> mice treated with wt T cells). In independent groups of wt mice (n=9), untreated Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=9), and Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving either wt T cells (n=9) or Fut7<sup>-/-</sup> T cells (n=5), Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving Fut7<sup>-/-</sup> T cells showed a higher hemorrhagic score than those receiving wt T cells (Kruskal-Wallis test, *P*=0.0628; Dunn test, \$*P*<0.05 vs Rag2<sup>-/-</sup> mice receiving wt T cells).

administration after severe stroke could potentially reduce HT without exacerbating brain damage. Interestingly, a recent study reported that administration of regulatory T cells reduced HT induced by delayed treatment with tissue-type plasminogen activator (tPA) in suture and embolic stroke mouse models, and the effect was related to attenuation of tPA-induced endothelial damage.<sup>42</sup> PSGL-1 is involved in the suppressive activity of regulatory T cells, at least under certain experimental conditions.<sup>43</sup> Further studies are needed to find out whether PSGL-1 mediates the effects of regulatory T cells in stroke.

Previous clinical studies have stressed the contribution of neutrophils and the NLR to the risk of HT after thrombolysis.<sup>13,44</sup> In contrast, we did not find a clear relationship between neutrophil counts and the NLR with HT. A main difference between our study and those previous studies is that we did not use tPA. tPA promotes neutrophil transmigration to reperused tissue via proteolytic activation of plasmin and gelatinases,<sup>45</sup> and it induces neutrophil degranulation.<sup>46</sup> Furthermore, neutrophil extracellular traps impair tPA-induced thrombolysis.<sup>47</sup> Therefore, the potentially damaging effect of neutrophils at the blood-brain barrier could be exaggerated by tPA.

Animals with large infarctions develop lymphopenia but the extent of the response shows some variation potentially attributable to the magnitude of neurohormonal responses.<sup>17</sup> Several lines of evidence suggest the possibility

of neuroanatomical correlates of stroke-induced immunodepression<sup>48</sup> that could explain why poststroke lymphopenia is more severe in some individuals than others despite similarly large lesion sizes. A limitation of our study is that it was performed only in male mice. The results will require validation in female mice because of sex-dependent differences in the inflammatory response and contribution of immune cells to stroke outcome.<sup>49</sup>

Collectively, our results highlight the role of platelets and memory T lymphocytes attenuating HT of ischemic stroke by binding platelets through functional PSGL-1, thus identifying a new cellular and molecular target for secondary HT prevention after ischemic stroke.

### Acknowledgments

We thank Dr J.M. Jou (Core Facility, Hospital Clinic) for help in blood analyses and Dr B. Hurtado for advice on platelet studies. We thank A. Hernández, C. Castellví, and F. Ruiz for excellent technical assistance. We acknowledge the Cytomics and Image Platforms of Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer for technical help.

### Sources of Funding

This study was supported by grants of Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-56279R, SAF2017-87459-R to A.M. Planas) and the ISCIII-Subdirección General de Evaluación (FIS PI15/00430 to A. Chamorro) cofinanced by the Fondo Europeo



de Desarrollo Regional (FEDER). M. Gallizioli had a fellowship of the European Innovative Training Networks program (FP7-PEOPLE-2013-ITN-n°07962). F. Miró-Mur had a PERIS award by the Health Department of Generalitat de Catalunya, and Y. Zhao had a scholarship of China Scholarship Council. Part of this work was performed at the Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona. The CERCA (Centres de Recerca de Catalunya) Programme of Generalitat de Catalunya supports Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) is supported by the MECI and the Pro CNIC Foundation and is a Severo Ochoa Center of Excellence (MECI award SEV-2015-0505).

### Disclosures

None.

### References

- Fisher M, Saver JL. Future directions of acute ischaemic stroke therapy. *Lancet Neurol*. 2015;14:758–767. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00054-X.
- Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larue V, Lesaffre E, Ringleb AP, Lorenzano S, Manelfe C, Bozzao L. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke*. 1999;30:2280–2284.
- Terruso V, D'Amelio M, Di Benedetto N, Lupo I, Saia V, Famoso G, Mazzola MA, Aridon P, Sarno C, Ragonese P, Savettieri G. Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *Neuroepidemiology*. 2009;33:261–265. doi: 10.1159/000229781.
- Mosimann PJ, Sirimarco G, Meseguer E, et al. Is intracerebral hemorrhage a time-dependent phenomenon after successful combined intravenous and intra-arterial therapy? *Stroke*. 2013;44:806–808. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.675678.
- Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, Ageno W, Alberti A, Lanari A, Caso V, Micheli S, Bertolani L, Venti M, Palmerini F, Biagini S, Comi G, Previsti P, Silvestrelli G. Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke*. 2008;39:2249–2256. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.510321.
- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, et al; HERMES Collaborators. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016;387:1723–1731. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
- Zaidat OO, Castonguay AC, Linfante I, et al. First pass effect: a new measure for stroke thrombectomy devices. *Stroke*. 2018;49:660–666. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.020315.
- Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, Sharp FR. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34:185–199. doi: 10.1038/jcbfm.2013.203.
- Whiteley WN, Slot KB, Fernandes P, Sandercock P, Wardlaw J. Risk factors for intracranial hemorrhage in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a systematic review and meta-analysis of 55 studies. *Stroke*. 2012;43:2904–2909. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.665331.
- Fagan SC, Nagaraja TN, Fenstermacher JD, Zheng J, Johnson M, Knight RA. Hemorrhagic transformation is related to the duration of occlusion and treatment with tissue plasminogen activator in a nonembolic stroke model. *Neurol Res*. 2003;25:377–382. doi: 10.1179/016164103101201526.
- Khatri R, McKinney AM, Swenson B, Janardhan V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2012;79(13 suppl 1):S52–S57. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70.
- Krueger M, Bechmann I, Immig K, Reichenbach A, Härtig W, Michalski D. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:292–303. doi: 10.1038/jcbfm.2014.199.
- Maestrini I, Strbian D, Gautier S, Haapaniemi E, Moulin S, Sairanen T, Dequatre-Ponchelle N, Sibolt G, Cordonnier C, Melkas S, Leys D, Tatlisumak T, Bordet R. Higher neutrophil counts before thrombolysis for cerebral ischemia predict worse outcomes. *Neurology*. 2015;85:1408–1416. doi: 10.1212/WNL.0000000000002029.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003;198:725–736. doi: 10.1084/jem.20021098.
- Urra X, Cervera A, Villamor N, Planas AM, Chamorro A. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience*. 2009;158:1174–1183. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.014.
- Mracsko E, Liesz A, Karcher S, Zorn M, Bari F, Veltkamp R. Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke. *Brain Behav Immun*. 2014;41:200–209. doi: 10.1016/j.bbi.2014.05.015.
- Miró-Mur F, Laredo C, Renú A, Rudilosso S, Zhao Y, Amaro S, Llull L, Urra X, Planas AM, Chamorro Á. Adrenal hormones and circulating leukocyte subtypes in stroke patients treated with reperfusion therapy. *Brain Behav Immun*. 2018;53:18–33.
- Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol*. 2008;83:1069–1078. doi: 10.1189/jlb.0907615.
- Lowe JB. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:531–538.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678–689. doi: 10.1038/nri2156.
- Li N, Ji Q, Hjemdahl P. Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. *J Thromb Haemost*. 2006;4:874–881. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01817.x.
- Blander JM, Visintin I, Janeway CA Jr, Medzhitov R. Alpha(1,3)-fucosyltransferase VII and alpha(2,3)-sialyltransferase IV are up-regulated in activated CD4 T cells and maintained after their differentiation into Th1 and migration into inflammatory sites. *J Immunol*. 1999;163:3746–3752.
- Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4+ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood*. 2004;104:3243–3248. doi: 10.1182/blood-2003-09-3047.
- Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity*. 2000;12:665–676.
- Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*. 2006;113:2105–2112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593046.
- Kleinschnitz C, Schwab N, Kraft P, Hagedorn I, Dreykluft A, Schwarz T, Austinat M, Nieswandt B, Wiendl H, Stoll G. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood*. 2010;115:3835–3842. doi: 10.1182/blood-2009-10-249078.
- Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*. 2014;346:1234–1238. doi: 10.1126/science.1256478.
- Nácher M, Blázquez AB, Shao B, Matesanz A, Prophete C, Berin MC, Frenette PS, Hidalgo A. Physiological contribution of CD44 as a ligand for E-selectin during inflammatory T-cell recruitment. *Am J Pathol*. 2011;178:2437–2446. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.039.
- de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C, Durduran T, Chamorro Á, Planas AM. Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke*. 2014;45:1453–1459.
- Orsini F, Villa P, Parrella S, et al. Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation*. 2012;126:1484–1494. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103051.
- Sun L, Zhou W, Mueller C, Sommer C, Heiland S, Bauer AT, Marti HH, Veltkamp R. Oxygen therapy reduces secondary hemorrhage after thrombolysis in thromboembolic cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1651–1660. doi: 10.1038/jcbfm.2010.50.
- Miró-Mur F, Pérez-de-Puig I, Ferrer-Ferrer M, Urra X, Justicia C, Chamorro A, Planas AM. Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain Behav Immun*. 2016;53:18–33. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.010.
- Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W. Flow-cytometric analysis of mouse platelet function. *Methods Mol Biol*. 2004;272:255–268. doi: 10.1385/1-59259-782-3:255.
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al; American Heart Association Stroke Council. 2018 guidelines for the early management of patients

- with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49:e46–e110. doi: 10.1161/STR.000000000000158.
35. Rodrigues SF, Granger DN. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*. 2010;87:291–299. doi: 10.1093/cvr/cvq090.
  36. Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011;9(suppl 1):56–65. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x.
  37. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*. 2015;3:e978720. doi: 10.4161/21688370.2014.978720.
  38. Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol*. 1995;89:725–732.
  39. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:325–335. doi: 10.1038/nri1351.
  40. Skilbeck C, Westwood SM, Walker PG, David T, Nash GB. Population of the vessel wall by leukocytes binding to P-selectin in a model of disturbed arterial flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1294–1300.
  41. Spectre G, Zhu L, Ersoy M, Hjemdahl P, Savion N, Varon D, Li N. Platelets selectively enhance lymphocyte adhesion on subendothelial matrix under arterial flow conditions. *Thromb Haemost*. 2012;108:328–337. doi: 10.1160/TH12-02-0064.
  42. Mao L, Li P, Zhu W, Cai W, Liu Z, Wang Y, Luo W, Stetler RA, Leak RK, Yu W, Gao Y, Chen J, Chen G, Hu X. Regulatory T cells ameliorate tissue plasminogen activator-induced brain haemorrhage after stroke. *Brain*. 2017;140:1914–1931. doi: 10.1093/brain/awx111.
  43. Angiari S, Rossi B, Piccio L, et al. Regulatory T cells suppress the late phase of the immune response in lymph nodes through P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol*. 2013;191:5489–5500. doi: 10.4049/jimmunol.1301235.
  44. Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R. Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*. 2009;156:673–679. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00068.x.
  45. Carbone F, Vuilleumier N, Bertolotto M, et al. Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation *in vitro* via defined pathways. *Vascul Pharmacol*. 2015;64:16–27. doi: 10.1016/j.vph.2014.11.007.
  46. Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, Hessenauer M, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, Zahler S, Krombach F, Reichel CA. Tissue plasminogen activator promotes post-ischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1495–1504. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303721.
  47. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2018;49:754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896.
  48. Urrea X, Laredo C, Zhao Y, Amaro S, Rudilosso S, Renú A, Prats-Galino A, Planas AM, Oleaga L, Chamorro Á. Neuroanatomical correlates of stroke-associated infection and stroke-induced immunodepression. *Brain Behav Immun*. 2017;60:142–150. doi: 10.1016/j.bbi.2016.10.004.
  49. Dotson AL, Wang J, Saugstad J, Murphy SJ, Offner H. Splenectomy reduces infarct volume and neuroinflammation in male but not female mice in experimental stroke. *J Neuroimmunol*. 2015;278:289–298. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.020.

### Highlights

- Large ischemic brain lesions facilitate hemorrhagic transformation at reperfusion after ischemic stroke.
- Platelets seal leaky blood vessels and prevent hemorrhages secondary to severe brain ischemia/reperfusion.
- Lymphopenia increases the risk of hemorrhagic transformation after severe ischemic stroke.
- Transfer of T cells to lymphopenic mice prevents hemorrhagic transformation after brain ischemia/reperfusion.
- CD4 memory T cells bind platelets through the P-selectin glycoprotein ligand-1/P-selectin axis, and T cells unable to bind P-selectin do not prevent hemorrhagic transformation in lymphopenic mice.



## ARTÍCULO Nº3

**Lymphocyte-independent effects of Fingolimod attenuate hemorrhagic transformation in experimental ischemic stroke**

Angélica Salas-Perdomo, Francesc Miró-Mur, Vanessa H. Brait, Carles Justicia, Anja Meissner, Xabier Urra, Angel Chamorro, Anna M. Planas.

En revisión.

Este artículo se centra en el estudio de la neuroprotección por medio del fármaco inmunomodulador Fingolimod. Durante años la inmunomodulación ha sido estudiada con el fin de disminuir la respuesta inflamatoria desencadenada por el ictus isquémico, pero generalmente está enfocada a la fase temprana de la patología. El objetivo de este trabajo es buscar los mecanismos implicados en el efecto protector del Fingolimod frente a la transformación hemorrágica después de la isquemia/reperfusión cerebral en ratón.

**Resumen:** la transformación hemorrágica (TH) es una complicación del ictus isquémico grave que generalmente se desencadena después de la terapia de revascularización. Además, los pacientes con recuentos bajos de plaquetas no pueden beneficiarse de estas terapias debido al alto riesgo de TH.

Estudios experimentales han demostrado que el Fingolimod reduce el volumen de infarto cerebral tras la isquemia/reperfusión y también la TH secundaria. El Fingolimod también ha dado resultados prometedores en estudios con grupos pequeños de pacientes y actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico en pacientes con ictus isquémico, tratados con terapias de reperfusión. El Fingolimod actúa sobre varios receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P) y previene el tráfico de linfocitos desde los ganglios linfáticos hacia el tejido inflamado. Además, los receptores S1P también se expresan en las células vasculares y cerebrales, sin embargo, los mecanismos subyacentes al efecto del Fingolimod atenuando la transformación hemorrágica son desconocidos.

En este trabajo se ha estudiado si el efecto protector del Fingolimod frente a la TH después de la isquemia/reperfusión depende de su conocida acción sobre los linfocitos y si el Fingolimod es eficaz en casos de trombocitopenia. Después de la oclusión de la arteria cerebral media durante 45 minutos, se investigó la expresión cerebral de los componentes de señalización de S1P, la concentración de S1P y células T infiltrantes. Para averiguar la implicación de los linfocitos en el efecto del Fingolimod, se han utilizado ratones Rag2<sup>-/-</sup> deficientes en linfocitos, y también se han depleccionado las plaquetas de los ratones.

Los resultados demuestran un aumento de expresión de la quinasa SphK2 que genera S1P. Mediante espectrometría de masas se ha detectado un aumento de S1P en el cerebro isquémico y la consiguiente atracción de linfocitos S1P1+. En ratones Rag2<sup>-/-</sup>, la isquemia/reperfusión cerebral no reduce la incidencia de TH, pero sí el grado de sangrado, demostrando que el Fingolimod protege de la TH por mecanismos independientes de linfocitos. El Fingolimod previene la degradación de la proteína de adhesión celular, b-catenina, inducida por la isquemia/reperfusión cerebral lo que sugiere que este fármaco puede ejercer efectos vasculoprotectores. Finalmente, se ha querido comprobar si el Fingolimod podría ser eficaz en condiciones de trombocitopenia. Sin embargo, no se han encontrado efectos protectores frente a la TH. Por lo tanto, se ha concluido que el Fingolimod atenúa la TH de forma independiente de linfocitos pero dependiente de plaquetas.

**Lymphocyte-independent effects of Fingolimod attenuate hemorrhagic transformation in experimental ischemic stroke**

Angélica Salas-Pérdomo<sup>1,2</sup>, Francesc Miró-Mur<sup>2</sup>, Vanessa H. Brait<sup>2,#</sup>, Carles Justicia<sup>1,2</sup>, Anja Meissner<sup>2,&</sup>, Xabier Urrea<sup>2,3</sup>, Angel Chamorro<sup>2,3</sup>, Anna M. Planas<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Àrea de Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Functional Unit of Cerebrovascular Diseases, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Current address:

<sup>#</sup> V.B. The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.

<sup>&</sup> A.M. Department of Experimental Medical Sciences & Wallenberg Center for Molecular Medicine, Lund University, Sweden.

\* Corresponding author:

Anna M. Planas,

PhD IIBB-CSIC,

IDIBAPS

Rosselló 161, planta

6 08036-Barcelona,

Spain

e-mail: [anna.planas@iibb.csic.es](mailto:anna.planas@iibb.csic.es)

Tel: +34-93 363 83 27

Fax: +34-93 363 83 01

**Abstract**

Hemorrhagic transformation (HT) is a complication of severe ischemic stroke after revascularization treatments. Patients with low platelet counts are not eligible for reperfusion therapies due to a high risk of HT. The immunomodulatory drug Fingolimod attenuates HT in brain ischemia/reperfusion but the underlying mechanism is unknown. Fingolimod acts on several sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors, prevents lymphocyte trafficking to inflamed tissues, and also affects brain and vascular cells directly. We studied in mice whether the protective effect of Fingolimod against HT is mediated by lymphocytes, and whether Fingolimod is effective in thrombocytopenia. Following 45-min middle cerebral artery occlusion, we studied brain expression of S1P signaling components, S1P concentration, and infiltrating T cells. To identify lymphocyte-independent actions, we used lymphocyte-deficient Rag2<sup>-/-</sup> mice, and induced thrombocytopenia with an anti-platelet serum. Ischemia rapidly upregulated S1P-generating kinase SphK1 mRNA, and increased brain S1P concentration and S1P receptor-1<sup>+</sup> T cells. Fingolimod did not reduce the incidence but attenuated the degree of HT in Rag2<sup>-/-</sup> mice, and reduced ischemia-induced degradation of adherens junction protein  $\beta$ -catenin. Low platelet counts strongly enhanced HT after ischemia/reperfusion but Fingolimod was ineffective in thrombocytopenia. These results show lymphocyte-independent vasculoprotective effects of Fingolimod attenuating the severity of HT after ischemia/reperfusion under normal platelet counts.

**Running Head:** Fingolimod and hemorrhagic transformation in ischemic stroke

**Keywords:** Cerebral ischemia/reperfusion; hemorrhagic transformation; middle cerebral artery occlusion; sphingosine-1-phosphate; mouse.

## Introduction

Hemorrhagic transformation (HT) is a complication of severe ischemic stroke that mainly occurs after reperfusion therapies.<sup>1</sup> Activation of metalloproteinases and severe endothelial damage following ischemia/reperfusion compromise the endothelial integrity facilitating the development of hemorrhage.<sup>2-4</sup> Certain conditions, such as low platelet counts, increase the risk of bleeding and reperfusion therapies are not recommended in these ischemic stroke patients.<sup>5</sup> Likewise, prior antiplatelet therapy is independently associated with HT after thrombolysis.<sup>6</sup> Treatments able to increase the safety of reperfusion therapies might benefit patients that are currently excluded from these treatments due to a high risk of HT. Fingolimod attenuates HT after brain ischemia in mice that received tissue plasminogen activator (tPA),<sup>7</sup> and preserves the blood-brain barrier in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis.<sup>8</sup> Fingolimod has protective effects in experimental ischemic stroke by reducing infarct volume and ameliorating neurological deficits.<sup>9</sup> Two small clinical trials showed that Fingolimod reduced infarct growth and improved neurological deficits in patients with ischemic stroke.<sup>10,11</sup> In combination with tPA, Fingolimod also reduced microvascular permeability and the risk of hemorrhagic complications in ischemic stroke patients. A clinical trial is ongoing to assess whether the combination of Fingolimod with reperfusion therapies is effective in attenuating reperfusion injury in patients with large vessel occlusion treated with 6 h of stroke onset.<sup>12</sup>

Fingolimod is an immunomodulatory drug binding the sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors 1, 3, 4 and 5.<sup>13</sup> Through its action on S1P receptor 1 (S1P1), Fingolimod causes severe lymphopenia by blocking the egress of lymphocytes from secondary lymphoid organs and preventing them from reaching inflamed tissues.<sup>14,15</sup> Due to the deleterious effects of T cells in the acute phase of ischemic stroke,<sup>16,17</sup> blockade of T cell migration to the brain is recognized as an important mechanism underlying the protective effects of Fingolimod in mice after ischemia/reperfusion. This concept is supported by the failure of Fingolimod to reduce the infarct volume in lymphocyte-deficient mice.<sup>18</sup> Furthermore, a selective S1P1 agonist reduced infarct volume after ischemia/reperfusion in mice only at doses able to induce sustained lymphopenia.<sup>19</sup> However, Fingolimod crosses the blood-brain barrier and, beyond the effects on immune cells, it exerts multiple actions in brain and vascular cells<sup>20-22</sup> due to the wide expression of S1P receptors in different cell types, including endothelial cells.<sup>23,24</sup>

This study aimed to elucidate mechanisms underlying the protective effect of Fingolimod on HT following cerebral ischemia/reperfusion in mice, and to examine whether Fingolimod could prevent HT under low platelet counts.

## Results

### *Ischemia upregulates the cerebral S1P pathway*

We studied the time course of mRNA expression of genes of the S1P pathway, including the S1P receptors (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 and S1P5) and the kinases involved in S1P generation, Sphk1 and Sphk2 (Fig. 1). Ischemia induced significant increases in S1P receptor mRNA expression (Fig. 1a) that peaked around 4 days post-ischemia. These delayed increases indicate the possible association of S1P receptors with the glial and endothelial reactions or infiltrating leukocytes. The S1P receptor mRNA showing the highest up-regulation was S1P3. The expression of Sphk2 mRNA showed a progressive weak increase that became statistically significant 7 days post-ischemia. In contrast, expression of Sphk1 mRNA showed a prominent increase after ischemia that was detected as early as 3h after reperfusion, peaking at 24h, and declining afterwards (Fig. 1a). We verified that the ischemia-induced increase in Sphk1 mRNA was independent of lymphocytes since it also occurred in lymphopenic Rag2<sup>-/-</sup> mice 24h post-ischemia (Fig. 1b). Likewise, the expression of Sphk2 was similar in Rag2<sup>-/-</sup> mice and wild type mice at this time point (Fig. 1b).

Given that the kinase SphK1 is a major contributor to S1P generation in several tissues, our results showing upregulation of SphK1 mRNA after ischemia suggested that this condition might increase the cerebral concentration of S1P. Mass spectrometry analysis in the brain tissue 24h post-ischemia showed elevated S1P levels in the ischemic hemisphere compared with the contralateral hemisphere (Fig. 2a). According to the function of S1P as T-cell chemoattractant, the raise of S1P was associated with higher counts of S1P<sup>+</sup> T lymphocytes in the ipsilateral versus the contralateral hemisphere, as assessed by flow cytometry (Fig. 2b).

### *Fingolimod attenuates hemorrhagic transformation independently of lymphocytes*

Fingolimod sequesters S1P<sup>+</sup> T cells in the lymph nodes preventing them from reaching the inflamed tissues.<sup>14,15</sup> This effect underlies the action of Fingolimod reducing infarct volume after ischemia/reperfusion.<sup>18</sup> To investigate whether blockade of lymphocyte trafficking also mediates the described protective effect of Fingolimod against HT after ischemia/reperfusion,<sup>7</sup> we administered Fingolimod or vehicle to lymphocyte-deficient Rag2<sup>-/-</sup> mice at reperfusion following 45-min MCAo. Two out of 17 mice (12%) in the control group and 4 out of 20 mice (20%) in the Fingolimod group died before 48h. Group differences in mortality were not statistically significant (Chi-square p=0.563). We could not obtain the brain of the dead mice due to *rigor mortis* and therefore we

excluded these mice from the study. The degree of bleeding was assessed in fresh brain tissue sections by assigning a hemorrhagic score (HS) ranging from 0 (absence of blood) to 5 (large parenchymal hematoma) (Fig. 3a,b, Supplementary Fig. S1). The same number of mice per group showed either complete absence of blood in the brain tissue (HS=0, n=3 per group) or small petechiae (HS=1, n=3 per group) (Fig. 3c). The number of mice showing some degree of intraparenchymal bleeding (HS>1) was similar between groups (n=9 vehicle group and n=10 Fingolimod group). However, among the mice with hemorrhages (HS>1), large intraparenchymal hematomas (HS>3) were less frequent (Fig. 3c) and the mean hemorrhagic score was lower (Fig. 3d) in the Fingolimod group than the vehicle group. Fingolimod also reduced the content of hemoglobin in the ipsilateral hemisphere as measured in brain homogenates of the same mice by a colorimetric assay (Fig. 3e).

We next studied the expression of proteins involved in blood-brain barrier function/integrity in Rag2<sup>-/-</sup> mice subjected to ischemia and treated with either Fingolimod or vehicle, and non-ischemic Rag2<sup>-/-</sup> mice that were used as controls. Neither ischemia nor Fingolimod changed the expression of the tight junction protein occludin (Fig. 3f). However, Fingolimod attenuated the ischemia-induced degradation of the endothelial adherens junction protein  $\beta$ -catenin in the brain tissue of Rag2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3g, h).

Furthermore Fingolimod improved the neurological deficit induced by ischemia in Rag2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3i). Altogether, the results show that, despite the fact that Fingolimod did not prevent the incidence of HT in lymphocyte-deficient mice, it reduced the degree of brain bleeding and neurological deficits.

#### *Fingolimod does not reduce brain bleeding after ischemia/reperfusion under low platelet counts*

To underscore the potential use of Fingolimod to attenuate hemorrhage in conditions at high risk of HT, we investigated whether the drug was able to protect thrombocytopenic mice from HT after ischemia/reperfusion. We used an anti-platelet serum that causes a strong reduction of platelet counts, i.e. platelet counts were undetectable during the first 16h, and were reduced to 9.7±2.3% and 24.7±15.3% of basal values at 24h and 48h, respectively (n=2 per time point). We depleted platelets in ischemic wild type mice that had received either Fingolimod or the vehicle by administering the anti-platelet serum 10 min after reperfusion. Two out of 10 mice of the Fingolimod group died during the preparation for sacrifice at 48h post-ischemia, which allowed brain extraction. Both mice showed large intraparenchymal hematomas (HS=5), and this information was included in the analysis. None of the 9 mice of the vehicle group died during the time of the study.



Compared to the vehicle, treatment with Fingolimod did not reduce the frequency or the degree of brain bleeding in platelet-depleted mice (Fig. 4 and Supplementary Fig. S2), indicating that the beneficial effects of Fingolimod reducing HT after brain ischemia/reperfusion were lost under low platelet counts.

## Discussion

This study reports an upregulation of S1P signaling in the brain after ischemia/reperfusion and shows that the S1P receptor modulator Fingolimod reduces the extent of brain bleeding independent of lymphocyte-specific effects. Cerebral ischemia/reperfusion induced a strong, rapid, and transient mRNA expression increase of the gene encoding for the S1P generating kinase SphK1. The concentration of S1P also increased in the ischemic brain tissue 24h following ischemia/reperfusion, suggesting that it was dependent on this SphK1. The S1P gradient is an important signal for homing of lymphocytes to inflamed tissues,<sup>14,15</sup> that might explain, at least in part, the higher numbers of S1P1<sup>+</sup> T cells we found in the brain tissue after ischemia/reperfusion. Fingolimod prevents lymphocyte egress from secondary lymphoid organs and access of lymphocytes to the inflamed tissues.<sup>14,15</sup> This effect underlies the action of Fingolimod reducing ischemic brain damage,<sup>18</sup> given the deleterious effect of lymphocytes in the acute phase of cerebral ischemia/reperfusion.<sup>16,17</sup> However, Fingolimod crosses the blood-brain barrier and thus may exert direct effects on a variety of brain-resident cells that express S1P receptors.<sup>20-25</sup> The mRNA expression of S1P receptors increased in the brain after ischemia/reperfusion generally starting from 16h post-ischemia and peaking at approximately day 4. This late peak suggests the possibility that ischemia-induced S1P receptor mRNA increases were related to the cerebral inflammatory response. Among the ischemia-induced enhanced expression of S1P receptor mRNAs, S1P3 mRNA showed the largest increases above control levels. Several lines of evidence suggest that S1P3 mediates the inflammatory responses in astrocytes<sup>25</sup> and endothelial cells.<sup>26,27</sup> While S1P3 and S1P2 promote inflammation under several experimental conditions, activation of S1P1 is associated with reduction of inflammation.<sup>26,27</sup>

Previous studies showed that Fingolimod reduces HT after ischemia/reperfusion.<sup>7</sup> Our results show that this effect is mediated, at least in part, by mechanisms independent of lymphocytes since Fingolimod attenuated the extent of bleeding and improved the neurological score in lymphocyte-deficient mice. Accordingly, a selective S1P1 agonist reduced the neurological deficits and brain edema in an experimental model of intracerebral hemorrhage both in wild type and Rag2<sup>-/-</sup> mice,<sup>28</sup> thus showing that the effect was independent of lymphocytes.

Selective S1P1 drugs may be more powerful against brain hemorrhage than Fingolimod since

one study found that Fingolimod was not protective after experimental intracerebral hemorrhage,<sup>29</sup> despite the fact that protective effects were found in a another intracerebral hemorrhage study in mice<sup>30</sup> and in a model of germinal matrix hemorrhage in rat pups.<sup>31</sup> Activation of S1P1 receptor causes cytoskeletal rearrangements promoting barrier functions in the vascular endothelium,<sup>23</sup> and S1P1-deficient mice die before birth due to hemorrhages.<sup>32</sup> We found that ischemia induced degradation of the adherens junction protein  $\beta$ -catenin whereas the expression of the tight junction protein occludin was not affected during the time frame of this study. Disruption of the endothelial adherens junction complex increases paracellular microvascular hyperpermeability in peripheral vascular beds where reduction of  $\beta$ -catenin plays a major role.<sup>33</sup> Furthermore, specific deletion of  $\beta$ -catenin in the endothelium decreases endothelial junctions, causes hemorrhages and is lethal at embryonic stages.<sup>34</sup> Although tight junctions in the brain are critically involved in maintaining BBB function,  $\beta$ -catenin links endothelial adherens junctions with the cytoskeleton and is also essential for the maintenance of BBB integrity. Accordingly, defective  $\beta$ -catenin transcription activity was found to reduce the expression of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-3, leading to brain hemorrhage.<sup>35</sup> In our study, Fingolimod attenuated ischemia-induced  $\beta$ -catenin degradation suggesting that it contributed to the preservation of vascular integrity after severe ischemia/reperfusion.

Recanalization therapies are not recommended in ischemic stroke patients with low platelet counts (<100,000 counts/ $\mu$ l) due to an increased risk of HT.<sup>5</sup> Platelets were critical players against HT following ischemia/reperfusion as demonstrated by the large hematomas developed by thrombocytopenic mice. Despite promoting barrier function and exerting vasculoprotective effects, Fingolimod was unable to reduce bleeding under low platelet counts. Thus, stressing the important hemostatic function of platelets in severe ischemic stroke. Platelet-endothelial interactions might prevent vascular leakage when the endothelium is severely injured.<sup>36,37</sup> Growing evidence supports that platelets can protect the endothelial barrier function by physical coverage of the damaged endothelium or through the local release of soluble vasculoprotective factors, like S1P.<sup>38</sup> However, our results show that Fingolimod does not lower the risk or severity of HT after reperfusion following ischemic stroke in mice with low platelets counts.

Altogether, these results show an activation of the S1P signaling pathway in the brain after ischemia/reperfusion suggesting that S1P receptor modulators may play a role in the brain tissue independent of drug effects on the immune system. Fingolimod attenuated HT after cerebral ischemia/reperfusion in a lymphocyte-independent fashion, but the drug was ineffective under thrombocytopenic conditions.

## Methods

### *Animals*

We used adult (12-16 weeks) male mice (total n=137). C57BL/6J wild type mice (#SN 000664, Jaxmice) (n=81) and lymphocyte-deficient Rag2<sup>-/-</sup> mice (n=56) on the C57BL/6J background (B6(Cg)-Rag2tm1.1Cgn/J, #SN008449, Jaxmice) were obtained from Charles River (Lyon, France). Mice were maintained under controlled SPF conditions in the animal house of the School of Medicine, University of Barcelona. Experiments were conducted with approval of the Ethical Committee of this University, CEEA (Comité Ètic d'Experimentació Animal), according to the Spanish law (Real Decreto 53/2013) and in compliance with the European regulations.

### *Brain ischemia*

Occlusion of the right middle cerebral artery (MCAo) was carried out under isoflurane anesthesia using a monofilament (#701912PK5Re, Doccol Corporation, Sharon, MA, USA), as described.<sup>39</sup> Cerebral blood flow (CBF) was monitored with laser Doppler flowmetry (Perimed, AB, Järfälla, Sweden). Reperfusion was induced after 45 min of arterial occlusion. At different time points, the mice were perfused through the heart with heparinized saline under isoflurane anesthesia.

### *Neurological score*

Two days post-ischemia we assessed the neurological dysfunction with a neurological score modified from a previously reported neuroscore.<sup>39</sup> The score ranged from 0 (no deficits) to 37 (poorest performance in all items) and it is calculated as the sum of the general and focal deficits, including the following general deficits (scores): hair (0-2), ears (0-2), eyes (0-3), posture (0-3), spontaneous activity (0-3), and epileptic behavior (0-1); and the following focal deficits: body symmetry (0-2), gait (0-4), climbing (0-3), circling behavior (0-3), forelimb symmetry (0-4), compulsory circling (0-3), and whisker response (0-4).

### *Drug treatment*

Treatment was randomly allocated using a random list that assigned a given treatment (A/B) to each mouse, and treatment was administered in a blinded fashion. Fingolimod (1mg/kg) (# 10006292, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) or the vehicle (saline containing 0.5% DMSO) was administered i.p. immediately after reperfusion following MCAo. For platelet depletion, mice received an i.p. injection of rabbit anti-mouse platelet serum (#CLA31440, Cedarlane, Burlington, NC, USA) (15 µl diluted in 200 µl of sterile saline) 10 min after reperfusion.

*Histological assessment of hemorrhagic transformation*

The brain was cut in 1mm-thick sections and pictures of fresh tissue were obtained to assess HT. A semi-quantitative method was used to evaluate the severity of brain hemorrhage by giving scores (0 to 5) depending on the size of the hemorrhage, with 0 for absence of hemorrhage and 5 for the maximal bleeding.<sup>39</sup>

*Quantification of brain hemoglobin content*

Mice were anesthetized and perfused through the heart with a phosphate-buffered saline pH 7.4, containing 0.16 mg/mL heparin. The brain was sectioned to obtain the hemorrhagic score as above. The ipsilateral (ischemic) and contralateral hemispheres were separated in each sections and the tissue of each hemisphere was pulled and processed to measure the brain hemoglobin content with a colorimetric assay (#700540, Cayman Chemical).

*qRT-PCR*

The ipsilateral and contralateral brain hemispheres were dissected out, frozen, and kept at - 80°C. RNA was extracted from brain tissue (Purelink RNA Kit, Invitrogen) and total RNA (500-1,000 ng) was reverse-transcribed using a mixture of random primers (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time RT-PCR analysis was carried out by the Taqman system (#4304437, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) using the iCycler iQTM Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

*Measurement of SIP concentration by mass spectrometry*

To extract SIP from the brain tissue, the contralateral and ipsilateral brain hemispheres were separated, weighed and homogenized in 1mL of 1M NaCl. SIP labeled with 7 deuterium (D- erythro-sphingosine-d7-1-phosphate, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) (30 µM) was added as the internal standard. After mixing the sample with 200 µl 6M HCl, samples were mixed with 2mL CHCl<sub>3</sub>. Samples were centrifuged at 19,000 xg for 3 min. The lower organic phase was transferred into a glass centrifuge tube using a glass Pasteur pipette and CHCl<sub>3</sub> was evaporated in a vacuum concentrator. Samples were dissolved in 100 µl MeOH:CHCl<sub>3</sub> (4:1) and analyzed by LC-MS/MS on an API 3000 (AB Sciex) triple quadrupole mass spectrometer integrated on an Acquity UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 2.6 µm XB C18 100Å 50 x 2.00 mm column was used as stationary phase. The column temperature was set at 60 °C. The Mobile phases consisted of (A) 75% methanol, 0.1% formic acid, and 5mM ammonium formiate, and (B) 100% methanol, 0.1% formic acid, and 5mM ammonium formiate. The gradient elution profile

was as follows: 0 min 100% A, from min 0 to min 2 the % A decreased from 100% to 0%, and was kept at 0% until min 5.5, when it was returned to initial conditions at minute 5.6 until minute 6. Flow was set at 0.6mL/min. Analyte was detected in positive electrospray ionization (ESI) mode. The ion spray voltage was set at 5000 Volts and source temperature at 400 °C. Data was acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Transitions selected were 380.1/264.4 for S1P and 387.3/271.5 for the internal standard. Results were integrated and calculated using linear regression by the Analyst 1.4.2 software (AB Sciex).

#### *Flow cytometry*

Cell isolation from brain tissue was performed as described.<sup>40</sup> Cells were incubated at 4 °C for 10 min with FcBlock followed by primary antibodies anti-CD3 (# 557869; clone 17A2; Alexa Fluor-647; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CD45 (# 553080; clone 30-F11; FITC, Horizon V500; BD Pharmingen), and anti-S1P receptor-1 (S1P1) (# FAB7089P; clone 713412; PE; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Brain cells were studied in a BD FACS Canto II cytometer using the FACS Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data analysis was performed with FlowJo software (v10 FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA).

#### *Western blotting*

For Western blotting, we obtained tissue from the ipsilateral (ischemic) and contralateral brain hemispheres. Proteins were extracted in radio-immunoprecipitation buffer (RIPA) containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete™, Roche, Basel, Switzerland).

Electrophoresis was carried out in 10% polyacrylamide gels and proteins were transferred to membranes (Immobilon-P, PVDF, # IPVH00010, MilliporeSigma, Merck, Burlington, MA, USA) that were incubated overnight at 4°C with one of the following antibodies: a mouse monoclonal antibody anti-β-catenin (# 610154, BD Biosciences) diluted 1:16,000, or a rabbit polyclonal antibody anti-occludin (# 71-1500, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted 1:250. A rabbit polyclonal antibody anti-GAPDH (# ab181602, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:20,000, or a mouse-monoclonal antibody anti-β-tubulin (# T4026, Sigma) diluted 1:500,000 were used as the loading controls. Quantification of band intensity was carried out with Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The ratio of the signal intensity versus the loading control was calculated. Values are expressed as fold vs. the mean value of control tissue run in each blot.

#### *Statistical analyses*

Two-group comparisons were carried out with the Mann–Whitney U test. Multiple groups were compared with the Kruskal-Wallis test followed by subsequent post-hoc



analysis with the Dunn's test. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used to compare treatment groups by brain hemisphere. Chi-square was used to compare frequencies between groups. Statistical analyses were performed using GraphPad v5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The specific tests and n values for each experiment are reported in each figure legend.

## References

1. Paciaroni, M. *et al.* Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke* **39**, 2249-2256 (2008).
2. Wang, X. *et al.* Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke* **35** (11 Suppl 1), 2726-2730 (2004).
3. Jickling, G.C. *et al.* Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**:185-199 (2014).
4. Krueger, M. *et al.* Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 292-303 (2015).
5. Powers, W.J. *et al.* American Heart Association Stroke Council. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **49**, e46-e110 (2018).
6. Chen, S. *et al.* Does Prior Antiplatelet Treatment Increase the Risk of Hemorrhagic Transformation and Unfavorable Outcome on Day 90 after Intravenous Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke Patients? *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **25**, 1366-1370 (2016).
7. Campos, F. *et al.* Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model. *Stroke* **44**, 505- 511 (2013).
8. Foster, C.A. *et al.* FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis: expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage. *Brain Pathol.* **19**, 254-266 (2009).

9. Liu, J., Zhang, C., Tao, W., & Liu, M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 (Fingolimod) in animal models of stroke. *Int. J. Neurosci.* **123**, 163-169 (2013).
10. Fu, Y. *et al.* Impact of an immune modulator Fingolimod on acute ischemic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 18315-18320 (2014).
11. Zhu, Z. *et al.* Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial. *Circulation* **132**, 1104-1112 (2015).
12. Zhang, S. *et al.* Rationale and design of combination of an immune modulator Fingolimod with Alteplase bridging with Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke (FAMTAIS) trial. *Int. J. Stroke.* **12**, 906-909 (2017).
13. Brinkmann, V. *et al.* The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 21453-21457 (2002).
14. Mandala, S. *et al.* Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**, 346-349 (2002).
15. Aoki, M., Aoki, H., Ramanathan, R., Hait, N.C. & Takabe, K. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators Inflamm.* 10.1155/2016/8606878 (2016).
16. Yilmaz, G., Arumugam, T.V., Stokes, K.Y. & Granger, D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* **113**, 2105-2112 (2006).
17. Kleinschnitz, C. *et al.* Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* **115**, 3835-3842 (2010).
18. Kraft, P. *et al.* FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection. *Stroke* **44**, 3202-3210 (2013).
19. Brait, V.H., Tarrasón, G., Gavaldà, A., Godessart, N. & Planas, A.M. Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Agonist Is Protective Against Ischemia/Reperfusion in Mice. *Stroke* **47**, 3053-3056 (2016).
20. Cipriani, R., Chara, J.C., Rodríguez-Antigüedad, A & Matute, C. FTY720 attenuates

- excitotoxicity and neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **12**:86 (2015).
21. Qin, C. *et al.* Fingolimod Protects Against Ischemic White Matter Damage by Modulating Microglia Toward M2 Polarization via STAT3 Pathway. *Stroke* **48**, 3336-3346 (2017).
22. Dong, Y.F. *et al.* S1PR3 is essential for phosphorylated Fingolimod to protect astrocytes against oxygen-glucose deprivation-induced neuroinflammation via inhibiting TLR2/4- NFκB signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 3159-3166 (2018).
23. Garcia, J.G. *et al.* Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.* **108**, 689-701 (2001).
24. Liu, Y. *et al.* Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* **106**, 951-961 (2000).
25. Dusaban, S.S., Chun, J., Rosen, H., Purcell, N.H. & Brown, J.H. Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes. *J. Neuroinflammation.* **14**, 111 (2017).
26. Nussbaum, C. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nat. Commun.* **6**, 6416 (2015).
27. Sammani, S. *et al.* Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **43**, 394-402 (2010).
28. Sun, N. *et al.* Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Modulation Attenuates Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* **47**, 1899-1906 (2016).
29. Schlunk, F., Pfeilschifter, W., Yigitkanli, K., Lo, E.H. & Foerch, C. Treatment with FTY720 has no beneficial effects on short-term outcome in an experimental model of intracerebral hemorrhage. *Exp. Transl. Stroke Med.* **8**:1 (2016)
30. Rolland, W.B. *et al.*, FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice. *Acta Neurochir. Suppl.* **111**, 213-217 (2011).

31. Rolland, W.B. *et al.* Fingolimod confers neuroprotection through activation of Rac1 after experimental germinal matrix hemorrhage in rat pups. *J. Neurochem.* **140**, 776-786 (2017).
  
32. Liu, Y. *et al.* Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* **106**, 951-961 (2000).
  
33. Sawant, D.A., Tharakan, B., Hunter, F.A., Smythe, W.R. & Childs, E.W. Role of  $\beta$ -catenin in regulating microvascular endothelial cell hyperpermeability. *J. Trauma* **70**, 481- 487 (2011).
  
34. Cattelino, A. *et al.* The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J. Cell Biol.* **162**, 1111–1122 (2003).
  
35. Tran, K.A. *et al.* Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis. *Circulation* **133**, 177-186 (2016).
  
36. Ho-Tin-Noé, B., Demers, M. & Wagner, D.D. How platelets safeguard vascular integrity. *J. Thromb. Haemost.* **9**, S1:56-65 (2011).
  
37. Rodrigues, S.F. & Granger, D.N. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* **3**, e978720 (2015).
  
38. Schaphorst, K.L. *et al.* Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L258-267 (2003).
  
39. Salas-Perdomo, A. *et al.* T Cells Prevent Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke by P-Selectin Binding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* ATVB.AHA.118.311284 (2018).
  
40. Miró-Mur, F., *et al.* Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain Behav. Immun.* **53**, 18-33 (2016).

**Acknowledgments**

Supported by a grant from the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (SAF2017- 87459-R to AMP), and a grant (FIS PI15/00430 to AC) co-financed by the *Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)*. We are grateful to David Bellido from the *Centres Científics i Tecnològics* of the University of Barcelona for the mass spectrometry analyses. We thank the *Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut (PERIS)* program of the Health Department of the *Generalitat de Catalunya* for supporting FMM, the *Centre de Recerca Biomèdica Cellex*, Barcelona, where part of this work was performed, and the *Centres de Recerca de Catalunya (CERCA)* Programme of the *Generalitat de Catalunya* for supporting the *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)*.

**Author Contributions**

ASP performed ischemia and conducted mRNA studies; FMM designed the flow cytometry study and analysed data; VB carried out flow cytometry and SIP studies with help of AM; CJ contributed to the ischemia model; XU and AC provided input for the study design; AMP designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript.

**Competing Interests**

The authors declare no competing interests.

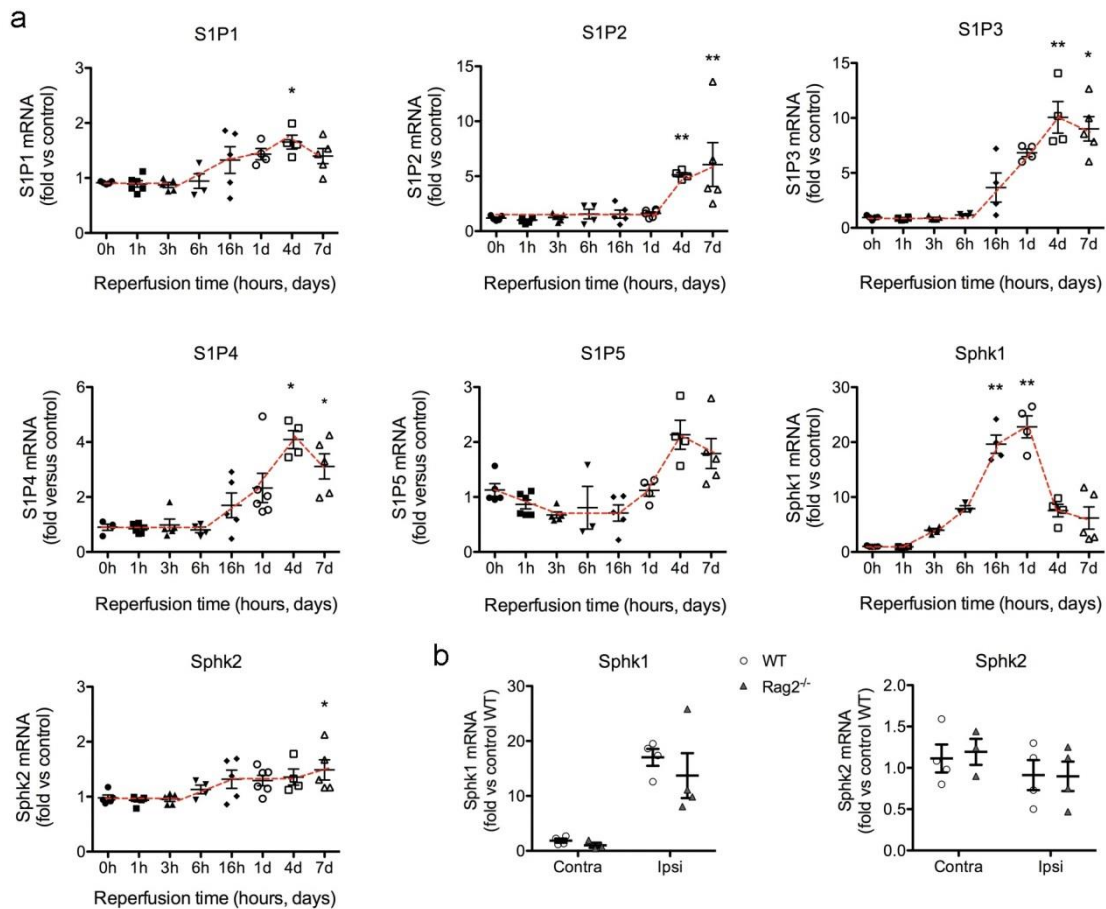
**Data availability**

Most data is provided in the manuscript and Supplementary information. Other data will be available from the corresponding author upon reasonable request.



## Figures

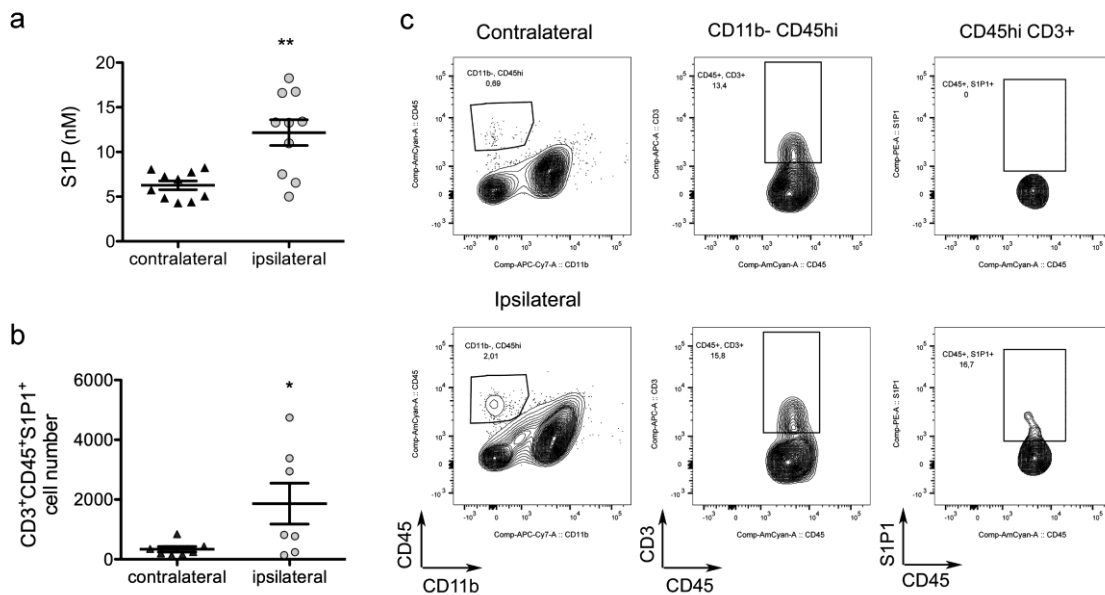
Figure 1



**Figure 1. Time-dependent changes in mRNA expression of genes involved in the S1P signaling axis.** a) Mice (n=41) were subjected to 45 min MCAo and were sacrificed at different time points: immediately without reperfusion (time 0) (n=6) or at 1h (n=6), 3h (n=5), 6h (n=4), 16h (n=5), 24h (n=6), 4 days (n=4), or 7 days (n=5) after reperfusion. mRNA expression of the genes encoding for S1P receptors S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 and S1P5, and for the kinases generating S1P, Sphk1 and Sphk2 in the ipsilateral (ischemic) hemisphere were assessed. Results are expressed as fold versus non-ischemic control brain tissue. S1P1, S1P3 and S1P4 mRNAs increased from 16h of reperfusion, peaking after 4 days. S1P2 mRNA did not change until day 4 and 7, whereas increases in S1P5 mRNA were not statistically significant. Sphk1 mRNA was strongly upregulated, with increases already detected at 3h of reperfusion, peaking at 24h, and then declining. In contrast, the mRNA expression of Sphk2 was rather stable and only showed a small tendency to increase progressively and reached statistically significant differences versus control at day 7. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. time 0. b) The expression of Sphk1 and Sphk2 mRNA was studied 24h post-ischemia in the ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) hemispheres of an independent group of wild type mice

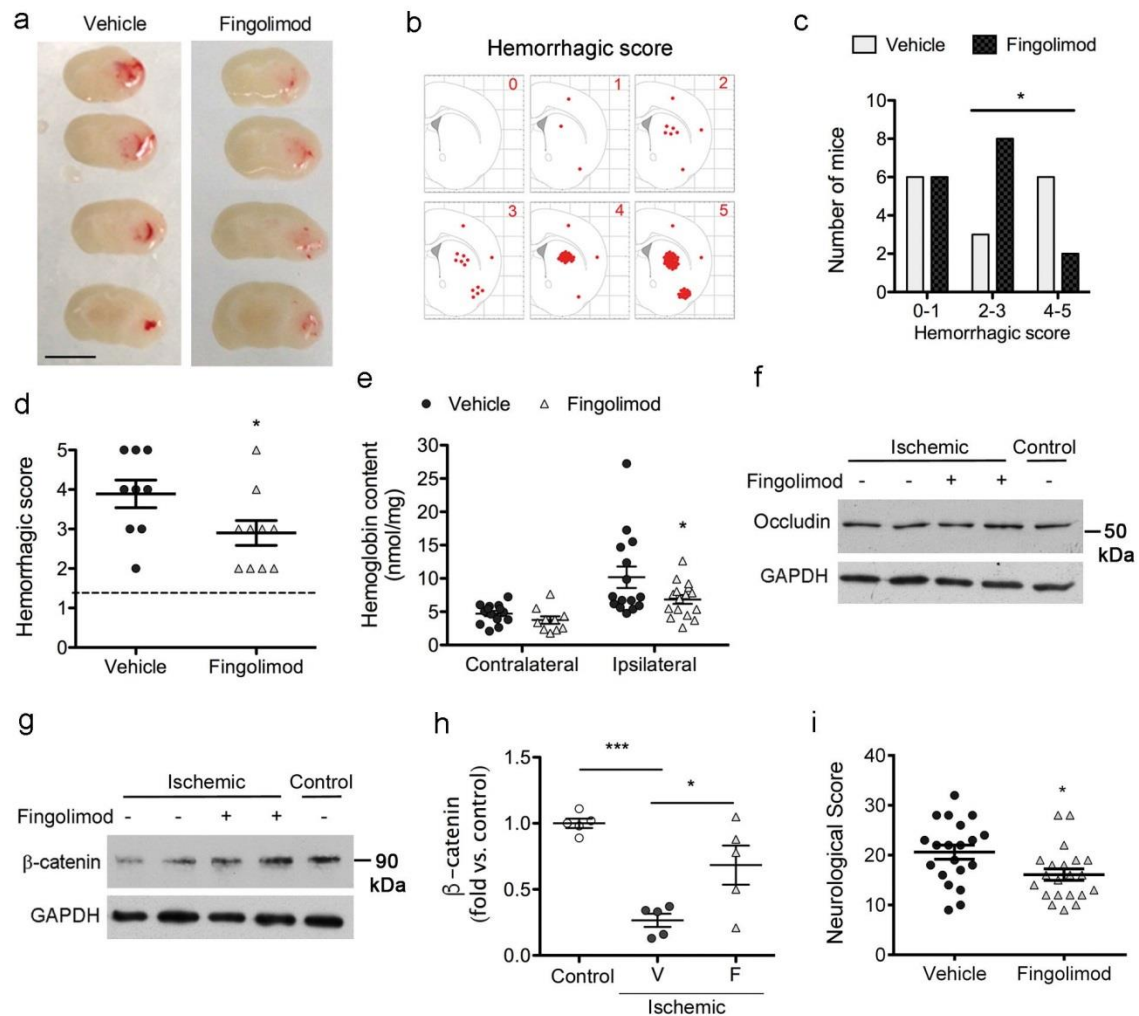
(WT) and  $Rag2^{-/-}$  mice 24h post-ischemia (n=4 per group). The increase in Sphk1 mRNA induced by ischemia did not differ between genotypes (Two-way ANOVA, genotype effect  $p=0.402$ , hemisphere effect  $p<0.001$ , interaction  $p=0.614$ ). SphK2 mRNA expression did not change between genotypes. Values are expressed as fold versus wild type control.

Figure 2



**Figure 2. Ischemia increases the brain concentration of S1P and the recruitment of S1P<sup>+</sup> T cells.** a) S1P concentration was measured in the contralateral and ipsilateral (ischemic) brain hemispheres 24h after MCAo (n=10) by mass spectrometry. Ischemia significantly increased the S1P concentration in the ipsilateral hemisphere (Mann-Whitney test,  $**p=0.007$ ). b) The presence of S1P1<sup>+</sup> T cells in the ipsilateral and contralateral brain hemispheres was evaluated 4 days post-ischemia by flow cytometry (n=7). Ischemia significantly increases the numbers of S1P1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T cells (Mann-Whitney test,  $*p=0.047$ ). c) Illustrative flow cytometry plots of brain tissue obtained from the contralateral and ipsilateral (ischemic) brain hemispheres show S1P1<sup>+</sup> T cells in the ischemic hemisphere.

Figure 3

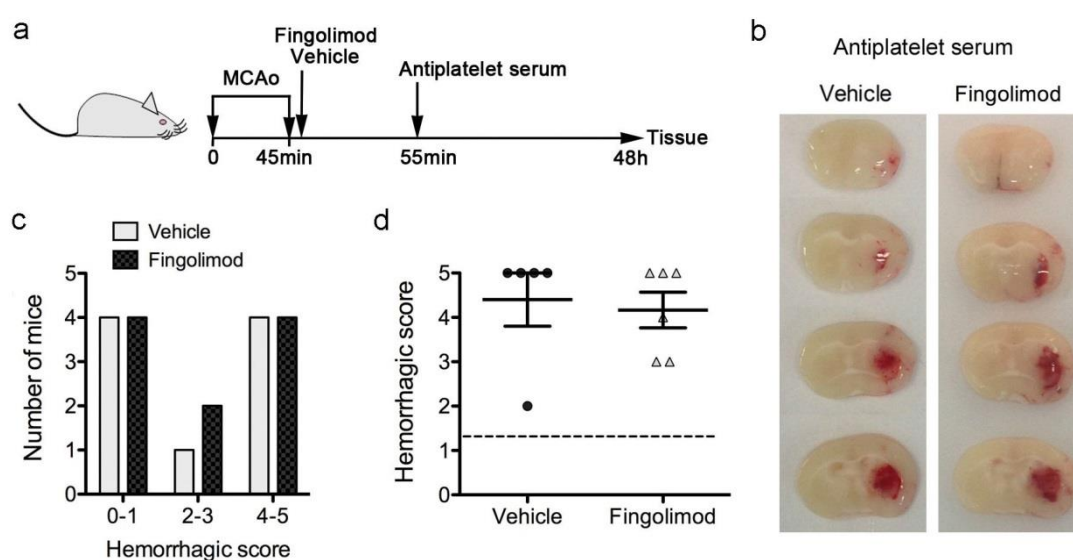


**Figure 3. Fingolimod attenuates the degree of hemorrhagic transformation in lymphocyte-deficient mice.** *Rag2*<sup>-/-</sup> mice were subjected to ischemia and received Fingolimod (1mg/Kg, i.p.) or vehicle at reperfusion. a) Representative fresh brain tissue sections of *Rag2*<sup>-/-</sup> mice treated with Fingolimod (n=16) or vehicle (n=15) obtained at 48h of reperfusion. See expanded data in Supplemental Fig. S1. b) We assigned a hemorrhagic score (HS) following a scale ranging from 0 (no blood in the brain) to 5 (large parenchymal hematoma). c-d) The distribution of mice among the different HS categories showed a similar number of mice devoid of bleeding or with small petechiae (HS=0-1) in both treatment groups. However, among the mice with some degree of hemorrhage (HS>1), large hemorrhages (HS>3) were less frequent in the Fingolimod group (two-sided Chi square, p=0.040) (c), and the mean HS was lower in the Fingolimod group (one-sided Mann-Whitney test, p=0.025) (d). e) Brain hemoglobin content in the ipsilateral (ischemic) and contralateral hemispheres showed a small reduction in the ipsilateral hemisphere after Fingolimod (n=16) vs. vehicle (n=15). Two-way ANOVA by group and hemisphere (\*p<0.05 Fingolimod vs. vehicle in the ipsilateral hemisphere). f-g) Representative images of occludin (f) and β-catenin (g)

protein expression determined by western blotting in brain tissue of control and ischemic Rag2<sup>-/-</sup> mice that received either Fingolimod (+) or vehicle (-) (n=5 per group).

Occludin expression was not affected by ischemia or treatment. In contrast, ischemia induced degradation of  $\beta$ -catenin versus control (non-ischemic), and Fingolimod (+) attenuated this effect. h) Densitometric analysis of  $\beta$ -catenin western blots showed the group differences (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. \*\*\*p<0.001, \*p<0.05). V: vehicle, F: Fingolimod. i) Fingolimod attenuated the neurological deficit versus the vehicle (n=20 vehicle group; n=21 Fingolimod group) (Mann-Whitney test, \*p=0.018).

Figure 4



**Figure 4. Fingolimod does not reduce hemorrhagic transformation in platelet-depleted mice after severe brain ischemia.** a) Schematic illustration of the experimental design. Immediately after reperfusion following 45-min MCAo, wild type mice received an i.p. administration of Fingolimod (n=10) (1mg/kg) or vehicle (n=9). Ten minutes later, all the mice received an i.p. administration of anti-platelet serum. At 48h, fresh brain tissue was obtained to assess for the presence of blood in the ischemic tissue. b) Representative brain sections showing hemorrhages in thrombocypenic mice regardless of whether they receive vehicle and Fingolimod. c) A hemorrhagic score (HS) was assigned ranging from 0 (no bleeding) to 5 (large parenchymal hematoma). Mice were grouped according to HS categories as follows: (HS=0-1) no blood or small petechiae; (HS=2-3) moderate hemorrhages; (HS=4-5) large intraparenchymal hemorrhages. One mouse per group showed HS=0 and three mice per group showed HS=1. Among the mice showing intraparenchymal bleeding (HS>1), Fingolimod did not reduce the number of mice with large brain hematomas (HS>3) (Chi-square, p=0.621). Two of the mice in the Fingolimod group with HS=5 died at the time of sacrifice (48h). d) Amongst the mice showing intraparenchymal bleeding (HS>1) the mean HS was similar in both groups (Mann-Whitney test p=0.545).





*DISCUSIÓN*





El ictus es la segunda causa de muerte en personas mayores de 60 años, la causa más frecuente de discapacidad permanente y la segunda causa más común de demencia (Chamorro *et al.*, 2016). Se calcula que para el 2050 alrededor de 1,5 millones de personas en el mundo tendrán más de 65 años de edad (World Health Organization, 2012). Debido a este creciente envejecimiento de la población y al enorme impacto que tiene el ictus, existe una gran necesidad de investigar sobre esta enfermedad, los factores de riesgo, sus consecuencias y por supuesto, nuevos tratamientos.

El principal objetivo del tratamiento del ictus es el retorno del FSC al tejido hipoperfundido de la penumbra isquémica. El porcentaje de pacientes con ictus isquémico que recibe terapias de reperfusión aún es muy reducido a nivel mundial, pero va en aumento dada la eficacia de la trombectomía mecánica demostrada en los últimos años. Sin embargo, el nivel de reperfusión que se alcanza no siempre es el óptimo y además la reperfusión no está exenta de complicaciones. Aunque la reperfusión es indispensable para salvar el tejido cerebral hipoperfundido, esta puede tener efectos nocivos que se conocen como daño por reperfusión.

Diversos estudios han demostrado las alteraciones provocadas por la reperfusión, como el aumento de la producción de ROS y RNS, aumento de expresión de moléculas de adhesión intercelular, inflamación, disminución de la función y ruptura de la BHE, transformación hemorrágica del infarto y desarrollo de un fenotipo procoagulante/protrombótico de la pared vascular (Pérez-Asensio *et al.*, 2010; Granger and Kvietys, 2015).

En consideración a todo lo anteriormente expuesto, es posible que las terapias de reperfusión combinadas con otros fármacos puedan atenuar los daños desencadenados por la cascada de la isquemia/reperfusión y también puedan incrementar la eficacia y aplicabilidad del tratamiento contra el ictus isquémico agudo, minimizando las posibles complicaciones derivadas de estos tratamientos de reperfusión.

Esta tesis se ha enfocado en el estudio de dos principales consecuencias del daño por reperfusión como son el estrés oxidativo y la transformación hemorrágica del infarto en modelos animales. Sin embargo, los seres humanos que sufren un ictus suelen presentar enfermedades concomitantes que exacerban el daño por isquemia/reperfusión y es importante que en los modelos animales también se evalúen estos factores de riesgo o situaciones clínicas relacionadas con el ictus isquémico humano. Entender los mecanismos de la comorbilidad es indispensable para poder evitarlos o minimizarlos. Los modelos animales de isquemia son un buen método que nos permite evaluar los diversos mecanismos por separado al poder inducirlos o suprimirlos independientemente.

Teniendo en cuenta estas circunstancias, este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio del estrés oxidativo aumentado por hiperglucemia y en la transformación hemorrágica del infarto en condiciones de linfopenia. Así mismo, se ha estudiado la posibilidad de modular el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria como métodos para potenciar el tratamiento del ictus y minimizar los daños por reperfusión.

En el primer trabajo mostramos que los ratones a los que se les indujo hiperglucemia previamente a la I/R podían beneficiarse del tratamiento con el antioxidante natural ácido úrico (AU). Este trabajo extiende de este modo estudios preclínicos previos realizados con AU en condiciones experimentales de normoglucemia (Yu *et al.*, 1998; Squadrito *et al.*, 2000; Romanos *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2012; Onetti *et al.*, 2015).

El aumento de los niveles de glucosa en sangre se asocia a una peor recuperación funcional y mayor mortalidad (Capes *et al.*, 2001). Aproximadamente un 30 a 40% de los pacientes con ictus presentan hiperglucemia en el momento de su ingreso a urgencias, incluidos los pacientes sin diabetes (Kruyt *et al.*, 2010; Luitse *et al.*, 2012). La hiperglucemia en ausencia de diabetes es conocida como hiperglucemia por estrés y en modelos experimentales de tMCAO está asociada al daño por reperfusión (Yip *et al.*, 1991; Martín *et al.*, 2006; MacDougall and Muir, 2011; Tarr *et al.*, 2013), ya que perjudica la función vascular (Ergul *et al.*, 2009; Fabian and Kent, 2012), incrementa el daño de la BHE y favorece la activación de la MMP9 (Martín *et al.*, 2006; Kamada *et al.*, 2007).

La relación entre la hiperglucemia y el daño cerebral en el ictus isquémico se ha investigado tanto en modelos animales como en la clínica (Bruno *et al.*, 2002; Schaller and Graf, 2004a; Kruyt *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). En este estudio se ha podido observar que los animales que tenían unos niveles altos de glucosa en sangre presentaban infartos más grandes con un aumento del daño cerebral después de la isquemia/reperfusión.

Así mismo observamos que la hiperglucemia inducida en este modelo animal produjo un aumento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 vascular y en la infiltración de neutrófilos en el tejido cerebral. Las concentraciones altas de glucosa estimulan la transcripción de factores proinflamatorios como el factor nuclear- $\kappa$ B aumentando la producción de citoquinas y quimioquinas, promoviendo la inflamación (Iwasaki *et al.*, 2007), e incrementando la expresión de moléculas de adhesión endotelial ICAM-1, P-selectina y E-selectina (Omi *et al.*, 2002). Estudios en ratas diabéticas muestran una alta expresión de ICAM-1 tras la isquemia transitoria global (Ding, He and Li, 2005). Diversos estudios en modelos animales relacionan el aumento de la ICAM-1 y la infiltración de neutrófilos con un mayor volumen de infarto y una peor recuperación funcional tras la tMCAO (Kanemoto *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2003; Merchant, Gurule and Larson, 2003; Buck *et al.*, 2008; Perez-de-Puig *et al.*, 2015).

Aunque el tratamiento con AU en nuestro modelo redujo el volumen de infarto en ratones hiperglucémicos, no se observó una disminución significativa en el reclutamiento de neutrófilos en tejido cerebral isquémico inducido por la hiperglucemia. Sin embargo, consideramos que la evaluación del reclutamiento de neutrófilos habría requerido estudios más amplios, dada la alta variabilidad de la cantidad de neutrófilos infiltrantes en el modelo experimental de tMCAO.

Por medio de imágenes de MRI molecular se puede estudiar la inducción *in vivo* de ICAM-1 en el cerebro, mediante el uso de anticuerpos específicos unidos a agentes de contraste funcionales, como las partículas micrométricas de óxido de hierro (MPIOs), basándose en el acortamiento del tiempo T2\* (Deddens *et al.*, 2013). Usando esta técnica en este estudio, se ha observado *in vivo* un incremento de adhesión de anticuerpos  $\alpha$ ICAM-1 a las MPIOs en la pared de la vasculatura cerebral en ratones hiperglucémicos tras la tMCAO en comparación con los normoglucémicos.

Se ha demostrado que la hiperglucemia aumenta la adhesión e infiltración de leucocitos en modelos experimentales de isquemia/reperfusión (Panés *et al.*, 1996). La ICAM-1 es reconocida como una molécula crucial y determinante para la adhesión de los neutrófilos a la pared del vaso (Kurose *et al.*, 1994). En un estudio previo, se demostró que bloqueando la ICAM-1 *in vivo*, por medio de anticuerpos, se anulaba la presencia de mieloperoxidasa en el cerebro de ratas sometidas a tMCAO, lo que sugiere que la ICAM-1 está involucrada en la



adhesión de neutrófilos a la vasculatura cerebral tras la isquemia/reperfusión (Justicia *et al.*, 2003).

En el presente estudio, el incremento de la expresión de ICAM-1 en los vasos del cerebro de los ratones hiperglucémicos estaba acompañado por el incremento de la infiltración y extravasación de los neutrófilos al parénquima cerebral isquémico. Este hallazgo está en conjunción con el mayor volumen de infarto observado en los ratones hiperglucémicos y con estudios previos que muestran una mayor cantidad de neutrófilos adheridos a las células endoteliales humanas, cultivadas bajo condiciones de hiperglucemia (Omi *et al.*, 2002). Los resultados también refuerzan estudios *in vivo* que demuestran que en ratas hiperglucémicas se produce un incremento de neutrófilos infiltrados al cerebro isquémico tras la tMCAO (Lin *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2006).

Uno de los efectos perjudiciales más importantes de la hiperglucemia en la isquemia/reperfusión es el estrés oxidativo (Tsuruta *et al.*, 2010; Robbins and Swanson, 2014). La hiperglucemia favorece la producción de ROS, principalmente superóxido por NADPH oxidasa, especialmente durante la reperfusión (Suh *et al.*, 2008).

El AU es un potente antioxidante natural con acciones preventivas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Suh *et al.*, 2008). Diversos estudios de isquemia/reperfusión en ratas han demostrado que la administración de AU reduce el daño cerebral y mejora los resultados conductuales (Yu *et al.*, 1998; Haberman *et al.*, 2007; Romanos *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2012; Onetti *et al.*, 2015). Se ha observado que el AU protege contra el daño vascular por mediación del estrés oxidativo causado por la isquemia/reperfusión en ratas, ya que se ha observado que puede aumentar la luz vascular, disminuir la nitrosilación de proteínas de la vasculatura y el parénquima cerebral y reducir los niveles de IL18 circulantes (Onetti *et al.*, 2015). Además el AU muestra efectos beneficiosos sinérgicos con un rol protector al ser usado con el tratamiento trombolítico (tPA) en un modelo de isquemia tromboembólica en ratas (Romanos *et al.*, 2007).

El AU ha sido llevado a la clínica en el ensayo URICO-ICTUS, un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en fase 2b/3 que ha reclutado a 421 pacientes con ictus isquémico agudo (Chamorro *et al.*, 2014). Este ensayo confirmó que el tratamiento con rtPA en combinación con el AU es seguro, además también se demostró que en evaluaciones de subgrupos predefinidos de pacientes, la administración de AU reducía el volumen de infarto y mejoraba significativamente el resultado funcional en pacientes que presentaban hiperglucemia durante el episodio isquémico agudo (Amaro *et al.*, 2015). Estos resultados están en consonancia con los hallazgos actuales de este estudio que demuestra los efectos beneficiosos de la administración de AU en la isquemia/reperfusión cerebral en ratones con hiperglucemia.

En general, la reducción del volumen de infarto asociada a la administración del AU tras la isquemia/reperfusión en los ratones hiperglucémicos, fue relativamente pequeña (26%) pero robusta. Sin embargo, la administración de AU mostró una reducción no significativa en la infiltración de neutrófilos al tejido cerebral isquémico inducida por la hiperglucemia. Esta tendencia de reducción de los neutrófilos infiltrantes puede atribuirse al hecho de que los animales con hiperglucemia y tratados con ácido úrico presentaban infartos más pequeños. A pesar de que el reclutamiento de neutrófilos puede ser debido a un efecto quimioatrayente de los ROS (G. Wang *et al.*, 2016), según los resultados que obtuvimos parece que el AU no juega un papel demasiado importante en la prevención de la infiltración de neutrófilos, sin embargo, sí que puede atenuar los efectos prooxidantes que se le atribuyen a estas células sanguíneas

(Chacko *et al.*, 2016). El AU puede contribuir a reducir el volumen de infarto en los ratones hiperglucémicos a través de mecanismos independientes de la infiltración de neutrófilos, mecanismos que incluyen su efecto antioxidante con una gran eficacia en la limpieza de radicales libres derivados del peroxinitrito y sus efectos vasculoprotectores limitando la toxicidad de la glucosa y la muerte celular secundaria (Squadrito *et al.*, 2000; Onetti *et al.*, 2015).

Este estudio tiene algunas limitaciones, en particular el hecho de que solo se realizó en la fase aguda del ictus isquémico y sería necesario hacer estudios con tiempos más largos de recuperación. Por otra parte, fue imposible realizar tests conductuales ya que la infusión del AU por vía intravenosa implica la intervención quirúrgica de la extremidad posterior para acceder a la vena femoral y esto impide una evaluación conductual correcta y precisa. Además en el presente estudio, el AU solo fue administrado 1,5 horas tras la reperfusión. Son necesarios más estudios para poder valorar los efectos neuroprotectores del AU a largo plazo en animales de experimentación y también estudios con diversos tiempos de administración del fármaco después de la isquemia para poder hacer la traslación clínica de los resultados.

En resumen, este estudio ha demostrado que las altas concentraciones sanguíneas de glucosa incrementan la expresión vascular de ICAM-1, la infiltración de neutrófilos y exacerban el daño por isquemia/reperfusión. Aunque el estrés oxidativo no parece mediar la exagerada expresión vascular de la ICAM-1 y el reclutamiento de neutrófilos al tejido isquémico bajo condiciones de hiperglucemia, sí que está implicado en los efectos nocivos observados bajo esta condición, ya que el tratamiento con el potente antioxidante AU después de la isquemia/reperfusión reduce el tamaño de la lesión en los ratones a los que se les ha inducido hiperglucemia.

En el segundo trabajo se aborda la TH de la isquemia cerebral después de la reperfusión. Este artículo se centra en el estudio de las células T y su relación con la TH. La TH es una complicación secundaria al tratamiento de la isquemia y se considera clínicamente relevante cuando es sintomática, lo que suele suceder aproximadamente en el 3% de los pacientes tratados con trombólisis sistémica (Terruso *et al.*, 2009) y en el 5% de los pacientes que recibieron terapia sistémica e intraarterial (Mosimann *et al.*, 2013). La tasa de pacientes con TH sintomática tras una trombectomía mecánica es de 4,4% (Goyal *et al.*, 2016), pero esta cifra puede aumentar hasta un 11,3% cuando el dispositivo tiene que pasar múltiples veces para lograr una recanalización exitosa (Zaidat *et al.*, 2018). Se conoce que la TH ocurre principalmente en pacientes con infartos grandes (Terruso *et al.*, 2009; Whiteley *et al.*, 2012; Paciaroni *et al.*, 2015), sin embargo, se sabe muy poco de los mecanismos que la desencadenan.

Este estudio demuestra que los linfocitos T reducen el riesgo de TH. Además, confirma la relevancia del volumen del infarto como un factor crítico que incrementa el riesgo de TH. A su vez, los resultados de este estudio resaltan la comunicación bidireccional que existe entre las células T y las plaquetas, creando un puente entre la inmunidad y la hemostasia para prevenir la TH tras un ictus isquémico agudo.

En pacientes con ictus isquémico las terapias de reperfusión no se recomiendan cuando existen niveles bajos de plaquetas por el alto riesgo de TH (Powers *et al.*, 2018), debido al factor de riesgo inherente de TH con el uso de medicamentos antiplaquetarios (Whiteley *et al.*, 2012). Actualmente, hay una creciente evidencia que respalda el hecho de que las plaquetas favorecen la función de la barrera endotelial proporcionando una cobertura física cuando el

endotelio está dañado para prevenir fugas de sangre en los sitios de la lesión (Tailor, Cooper and Granger, 2005; Rodrigues and Granger, 2010, 2015; Ho-Tin-Noé, Demers and Wagner, 2011). Así mismo, los resultados obtenidos apoyan esta teoría, demostrando que las plaquetas rodean y sellan el vaso dañado y reducen la extravasación de sangre al parénquima cerebral isquémico.

Tanto las plaquetas como los leucocitos se adhieren al endotelio vascular tras la isquemia cerebral y los linfocitos T facilitan esta adhesión (Yilmaz *et al.*, 2006; Li, 2008). Los resultados evidencian que la unión de plaquetas-linfocitos está mediada en parte por las células T, dado que en los animales linfopénicos se favorecía la TH tras una isquemia grave.

En el ictus isquémico, los neutrófilos circulantes tienden a aumentar, mientras que el número de linfocitos disminuye de manera muy marcada, fenómeno que se conoce como linfopenia inducida por la isquemia (Prass *et al.*, 2003; Urra *et al.*, 2009; Mracsko *et al.*, 2014; Miró-Mur *et al.*, 2018). Además, después del tratamiento trombolítico, los pacientes suelen presentar una alta relación de neutrófilos/linfocitos (NLR) y esta relación puede predecir un mayor riesgo de TH sintomática en pacientes tratados con tPA (Maestrini *et al.*, 2015). A pesar de que se han relacionado los neutrófilos con la TH, el papel que podría tener la linfopenia en la TH se desconoce. En este estudio se observó que la linfopenia puede ser un factor de riesgo para la TH. Los ratones que presentaban hemorragias más graves tenían un menor número de linfocitos en sangre, y de igual manera, el bajo número de linfocitos se correlacionaba inversamente con la gravedad de la TH.

Además se encontró que las células T están involucradas en la prevención de la TH del infarto cerebral y lo hacen por medio de su unión a las plaquetas, a través del eje P-selectina-PSGL-1. Los linfocitos y las plaquetas interactúan a través de una compleja comunicación bidireccional que conlleva consecuencias funcionales para ambos tipos de células (Li, 2008; Yilmaz and Granger, 2008). El PSGL-1 interactúa con las selectinas y está involucrado en la adhesión de los leucocitos al endotelio activado y las plaquetas (Lalor and Nash, 1995; del Zoppo and Mabuchi, 2003; Ley and Kansas, 2004). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, para poder prevenir la TH, los sitios de unión del PSGL-1 en los linfocitos tienen que ser completamente funcionales ya que los animales con linfocitos defectuosos en la unión de PSGL-1 presentaban mayor TH tras la isquemia experimental.

En la inflamación se ha demostrado que la unión de plaquetas favorece selectivamente la adhesión de las células T memoria al endotelio de las vénulas inflamadas (Ley and Kansas, 2004). Los resultados mostraron que las células T memoria CD4<sup>+</sup> son el subgrupo de linfocitos T circulantes capaces de formar conjugados con las plaquetas. Este fenómeno podría resaltar el ya reconocido papel de las células T para promover la tromboinflamación y empeorar el daño cerebral después de la isquemia/reperfusión (Yilmaz *et al.*, 2006; Kleinschnitz *et al.*, 2010).

Sin embargo, las plaquetas también intervienen en la adhesión mediada por P-selectina de los linfocitos a la pared arterial, cuando se altera el flujo sanguíneo (Skilbeck *et al.*, 2001) y después de la exposición de las proteínas de la matriz subendotelial que puede ocurrir en el sitio de una lesión arterial (Spectre *et al.*, 2012). Nuestro estudio indica que las células T memoria facilitan la formación de tapones plaquetarios en el lado abluminal de los vasos severamente dañados y se encontró que este mecanismo está mediado por el eje PSGL-1-P-Selectina. Sin embargo, se necesitan más estudios de investigación para la identificación de todos los elementos moleculares y celulares involucrados en la agregación plaquetaria alrededor de los vasos dañados facilitada por las células T.

Los resultados de este estudio resaltan la íntima comunicación que existe entre plaquetas y linfocitos. Así mismo, subrayan el doble rol que desempeñan estos dos tipos celulares en la hemostasia y la inflamación, que en el contexto de la isquemia cerebral pueden tener efectos predominantemente negativos (tromboinflamatorios) o positivos (hemostáticos), probablemente dependiendo del lecho vascular, la integridad de los vasos y el riesgo de TH. Los efectos prohemostáticos de las células T predominan en infartos grandes con riesgo de experimentar TH. Por el contrario, los efectos perjudiciales de las células T se presentan en infartos leves o moderados con bajo riesgo de sufrir una TH.

En este estudio se identificó la linfopenia como un importante factor de riesgo para la TH en infartos grandes, planteando la cuestión de si la administración de células T puede potencialmente prevenir la TH tras el ictus isquémico, sin exacerbar el daño cerebral. Recientemente un estudio ha demostrado que la administración de células T reguladoras reduce la TH inducida por el tratamiento tardío con tPA en modelos murinos de isquemia inducida por el método del filamento y en modelos de embolia, y este efecto está mediado por una disminución del daño endotelial y una menor expresión de MMP9 y CCL2 tras la administración adoptiva de células T reguladoras (Mao *et al.*, 2017). De igual manera, hay otro estudio que demuestra que el PSGL-1 está involucrado en la actividad supresora de las células T reguladoras, al menos en ciertas condiciones experimentales (Angiari *et al.*, 2013). Sin embargo, se necesita más investigación para determinar como el PSGL-1 interviene en los efectos de las células T en el ictus isquémico.

Numerosos estudios clínicos previos han demostrado la contribución de los neutrófilos y del NLR al riesgo de TH del infarto tras el tratamiento trombolítico (Gautier *et al.*, 2009; Urra *et al.*, 2009; Maestrini *et al.*, 2015). Por el contrario, con los resultados obtenidos no se encontró una correlación clara entre los contajes de neutrófilos y el NLR con la TH. Quizás la principal diferencia entre los estudios previos con este, es que aquí no se usó tPA. Se conoce que el tPA promueve la transmigración de los neutrófilos al tejido reperfundido por medio de la activación proteolítica de la plasmina y las gelatinasas (Uhl *et al.*, 2014), e induce la degranulación de los neutrófilos (Carbone *et al.*, 2015). La neutrofilia incrementa el riesgo de TH después del tratamiento con tPA en la isquemia experimental (Gautier *et al.*, 2009). Además, las trampas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps, NETs) alteran la trombólisis inducida por tPA (Ducroux *et al.*, 2018), de este modo la administración de tPA podría exagerar el efecto nocivo de los neutrófilos sobre la BHE.

Los animales con infartos grandes desarrollan linfopenia, pero el alcance de esta muestra alguna variación potencialmente atribuible a la magnitud de las respuestas neurohormonales (Miró-Mur *et al.*, 2018). Además hay evidencias que sugieren la posibilidad de que existan correlaciones neuroanatómicas en la inmunosupresión inducida por el ictus (Urra *et al.*, 2017). Estas diversas variaciones podrían explicar por qué después del ictus isquémico la linfopenia es más grave en algunos individuos que en otros, a pesar de que presenten volúmenes de infarto similares.

Una limitación de este estudio es que se realizó solo en ratones machos. Los resultados requerirán validación en ratones hembra debido a las diferencias dependientes del sexo que ocurren en la respuesta inflamatoria y en la contribución de las células inmunes tras el ictus.

En resumen, los resultados obtenidos resaltan el rol de las plaquetas y las células T memoria atenuando la TH del infarto por medio de la unión de las plaquetas a través del PSGL-1. Estos resultados pueden determinar nuevas dianas celulares y moleculares para la prevención de la TH secundaria al ictus isquémico.

En el tercer trabajo, se ha intentado reducir la TH mediante un tratamiento farmacológico con el fármaco inmunomodulador Fingolimod. El Fingolimod es un tratamiento actualmente aprobado para pacientes con esclerosis múltiple (Liu *et al.*, 2013; Ayzenberg, Hoepner and Kleiter, 2016; Park and Im, 2017). El Fingolimod se une a varios receptores de S1P y su unión al receptor S1P1 explica su capacidad de secuestrar los linfocitos en los ganglios linfáticos y prevenir su migración a tejidos inflamados (Mandala *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2013; Aoki *et al.*, 2016). Sin embargo, el Fingolimod no solo tiene efectos sobre los linfocitos sino que también afecta a las células cerebrales y a la vasculatura que expresa varios receptores S1P (Groves, Kihara and Chun, 2013; Hunter, Bowen and Reder, 2016).

En este estudio se ha descrito que la isquemia/reperfusión induce la expresión cerebral de varios receptores S1P y sobre todo de la quinasa SphK1 capaz de generar S1P. Así mismo, se ha encontrado que la isquemia aumenta los niveles cerebrales de S1P a las 24 horas tras la reperfusión y esto causa la atracción de linfocitos S1P1<sup>+</sup> que encontramos en el parénquima cerebral.

Los efectos que el Fingolimod tiene sobre los linfocitos están muy reconocidos y es probable que sean la razón por la cual el Fingolimod reduce el daño cerebral en el ictus (Kraft *et al.*, 2013). Sin embargo, se conoce que el Fingolimod cruza la BHE y puede tener diversos efectos sobre las células que expresan receptores para S1P (Liu *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001; Cipriani *et al.*, 2015; Dusaban *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018). En este estudio se observó que la expresión génica de los receptores S1P aumentó en el cerebro tras 16 horas postreperfusión y su pico máximo fue aproximadamente al día 4 tras la I/R. Este pico tardío sugiere que el aumento de los receptores está relacionado con la respuesta inflamatoria cerebral causada por la I/R. Además se encontró que la expresión del receptor S1P3 mostró un aumento por encima de los niveles de control. Existen diversas líneas de evidencia que sugieren que S1P3 media las respuestas inflamatorias en astrocitos (Dusaban *et al.*, 2017) y en las células endoteliales (Sammani *et al.*, 2010; Nussbaum *et al.*, 2015). Así, mientras que S1P3 y S1P2 promueven la inflamación, la activación de S1P1 se asocia con la reducción de la inflamación (Sammani *et al.*, 2010; Nussbaum *et al.*, 2015).

Se ha descrito que el Fingolimod puede proteger frente a la TH del infarto cerebral (Rolland *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013), pero se desconoce si este efecto está mediado por su acción sobre los linfocitos, o bien por otras vías de acción del Fingolimod, por ejemplo, sobre la vasculatura. En este estudio se han utilizado animales deficientes en linfocitos para identificar los efectos del Fingolimod que no están mediados por linfocitos. Los resultados obtenidos demuestran que si bien este fármaco no reduce la incidencia de TH, sí reduce su gravedad, ya que los animales tratados con el fármaco no solo presentaban menores hemorragias, sino que además tenían menos déficits neurológicos. Además, estos resultados demuestran que este efecto del Fingolimod es mediado, al menos en parte, por mecanismos independientes de los linfocitos. De acuerdo con nuestros resultados, el estudio de Sun *et al.* (2016) en el modelo experimental de hemorragia intracerebral, demuestra que utilizando un agonista selectivo de S1P1 se obtuvo una reducción del déficit neurológico y del edema cerebral tanto en ratones salvajes como en ratones linfopénicos (Rag2<sup>-/-</sup>), demostrando así que el efecto era independiente de los linfocitos.

La activación del receptor S1P1 causa reordenamientos citoesqueléticos que promueven funciones de barrera en el endotelio vascular (Garcia *et al.*, 2001) y se ha observado que los ratones con deficiencia de S1P1 mueren antes del nacimiento debido a hemorragias (Liu *et al.*, 2000). En el presente estudio se observó que la isquemia induce la degradación de la  $\beta$ -catenina de las uniones adherentes (AJ), sin embargo la expresión de la ocludina de las uniones



estrechas (TJ) no se vio afectada durante el período de tiempo de este estudio. La alteración del complejo de uniones adherentes del endotelio aumenta la hiperpermeabilidad paracelular microvascular en los lechos vasculares periféricos, donde la reducción de  $\beta$ -catenina juega un papel importante (Sawant *et al.*, 2011). Aunque en el cerebro las TJ están críticamente involucradas en el mantenimiento de la función de la BHE, es la  $\beta$ -catenina la que vincula las AJ endoteliales con el citoesqueleto y, por lo tanto, también es esencial para el mantenimiento de la integridad de la BHE. Se ha descrito que la transcripción defectuosa de la actividad de la  $\beta$ -catenina reduce la expresión de las proteínas claudina-1 y claudina-3 y de las TJ, lo que conlleva la pérdida de la integridad de la BHE y desarrollo de hemorragia cerebral (Tran *et al.*, 2016). En este estudio, el Fingolimod atenuó la degradación inducida por isquemia de la  $\beta$ -catenina, sugiriendo que contribuyó a la preservación de la integridad vascular después de una I/R grave.

Por otra parte, se demostró que las plaquetas juegan un papel crítico en la TH tras la I/R, ya que los ratones trombocitopénicos desarrollaron hematomas grandes después de la inducción de la isquemia. Así mismo, los pacientes con ictus que presentan bajos recuentos plaquetarios no pueden ser tratados con las terapias de recanalización ya que se incrementa el riesgo de TH (Powers *et al.*, 2018). En este estudio se quiso probar si el tratamiento con Fingolimod podía ser una alternativa a las terapias tradicionales en los pacientes trombocitopénicos. A pesar de promover la función de la BHE y ejercer efectos vasculoprotectores, el Fingolimod no pudo reducir el sangrado en condiciones de trombocitopenia, lo que destaca la importante función hemostática de las plaquetas en el accidente cerebrovascular isquémico grave. Las interacciones plaqueta-endotelio pueden prevenir la pérdida de sangre cuando el endotelio está gravemente lesionado (Ho-Tin-Noé, Demers and Wagner, 2011; Rodrigues and Granger, 2015). Existen evidencias de que las plaquetas pueden proteger y ayudar en la función de la barrera endotelial mediante la cobertura física del endotelio dañado y también por medio de la liberación local de factores vasculoprotectores solubles, como S1P (Schaphorst *et al.*, 2003). No obstante, en nuestro estudio el Fingolimod no disminuyó el riesgo ni la gravedad de la TH del infarto en los ratones trombocitopénicos, con lo cual el Fingolimod no parece ser una buena opción que permita administrar terapias de reperfusión a los enfermos con bajo recuento de plaquetas ya que no reduce su elevado riesgo de TH.

En resumen, los resultados de este estudio muestran una activación de la vía de señalización S1P en el cerebro después de la I/R, esta activación sugiere que los fármacos moduladores del receptor S1P pueden desempeñar un papel en el parénquima independiente de los efectos del fármaco sobre el sistema inmune. También demostró que el Fingolimod puede atenuar la TH del infarto cerebral por una vía independiente de los linfocitos, pero el tratamiento no es efectivo en condiciones de trombocitopenia.

### **Discusión global**

En esta tesis se demuestra que, si bien la reperfusión es crítica para restablecer el aporte sanguíneo al tejido isquémico y prevenir la muerte neuronal, la reperfusión conlleva daños secundarios que se pueden prevenir, al menos en parte, mediante tratamientos farmacológicos.

En primer lugar se ha demostrado el efecto perjudicial del estrés oxidativo que está especialmente exacerbado por los niveles altos de glucosa en sangre. El efecto deletéreo del estrés oxidativo en la I/R se puede atenuar en gran medida mediante el tratamiento con AU después de la reperfusión. Estos resultados tienen un carácter traslacional puesto que el AU ya se ha probado en un ensayo clínico en pacientes con resultados prometedores.

Tal como sugieren los datos clínicos, las isquemias de gran tamaño son las más susceptibles de sufrir complicaciones tras la reperfusión, como es el caso de la TH. Hemos identificado que las plaquetas forman un tapón hemostático en la microvasculatura lesionada por la I/R, lo cual previene que las microhemorragias se transformen en hematomas intraparenquimales de gran tamaño que representan una complicación grave de la I/R. Dado que la trombocitopenia conlleva un alto riesgo de TH tras la I/R, y que los pacientes con bajo recuento de plaquetas no son elegibles para recibir terapias de reperfusión, se ha considerado si el fármaco inmunomodulador Fingolimod podría proteger de la TH en condiciones de trombocitopenia. Al igual que el AU, el Fingolimod se ha estudiado en pacientes con ictus, incluyendo pacientes tratados con tPA. Los resultados prometedores de dos pequeños ensayos clínicos se están ampliando actualmente en un ensayo clínico que se está llevando a cabo para estudiar el papel protector del Fingolimod frente a la I/R cerebral. Los resultados del presente estudio mostraron que el Fingolimod protege frente a la TH pero no es eficaz en condiciones de trombocitopenia y por tanto no sería una opción para tratar pacientes con bajo recuento de plaquetas.

En segundo lugar, además de la trombocitopenia, se ha identificado a la linfopenia como una condición que aumenta el riesgo de sufrir TH en casos de infartos grandes. Intentando explicar de qué modo los linfocitos podrían prevenir la TH, se ha encontrado que los linfocitos T son los responsables de atenuar la TH mediante su capacidad de unir plaquetas a través del eje PSGL-1/P-selectina. Así, los animales deficientes en linfocitos sufren mayor TH tras episodios graves de I/R, y este efecto se puede prevenir mediante transferencia adoptiva de linfocitos T. Sin embargo, la transferencia adoptiva de linfocitos T deficientes en la molécula PSGL-1, que media la unión de los linfocitos a P-selectina, a animales linfopénicos no previene la TH. La transferencia adoptiva de células T que no tienen sitios de unión a P-selectina funcionales tampoco previene la TH en ratones linfopénicos. Por lo tanto, la capacidad de las células T de unirse a la P-selectina es crítica para explicar el efecto protector de estas células frente a la TH. También se ha identificado que el subgrupo células T capaces de unir a la P-selectina y las plaquetas son los linfocitos T memoria. Los resultados demuestran que la linfopenia es un factor de riesgo para sufrir TH del infarto cerebral en lesiones grandes tras la I/R y estos resultados indican una línea de investigación de interés para llevar a cabo un estudio en muestras de sangre de pacientes con ictus isquémico.



## *CONCLUSIONES*





## CONCLUSIONES

---

- 1) La hiperglucemia exagera la lesión por isquemia/reperfusión cerebral aumentando la expresión de la molécula de adhesión vascular ICAM-1 en la vasculatura cerebral y la infiltración de neutrófilos al tejido afectado.
- 2) La administración intravenosa de ácido úrico reduce el tamaño de la lesión cerebral en ratones hiperglucémicos lo que demuestra el importante papel del estrés oxidativo en la lesión por isquemia/reperfusión, particularmente en condiciones de hiperglucemia.
- 3) La linfopenia inducida por el ictus, facilita la TH del infarto cerebral en ratones con lesiones grandes, lo que nos ha permitido identificar a la linfopenia como un factor de riesgo para sufrir TH.
- 4) Los linfocitos T se adhieren a las plaquetas a través del eje PSGL1/P-selectina, y la capacidad de los linfocitos de unirse a P-selectina es necesaria para prevenir la TH.
- 5) Los linfocitos T con capacidad de unión a la P-selectina plaquetaria son las células T memoria.
- 6) Las plaquetas forman un tapón hemostático en la microvasculatura cerebral lesionada que previene que las microhemorragias secundarias a las isquemias graves se transformen en grandes hematomas.
- 7) El fármaco inmunomodulador Fingolimod no reduce la incidencia pero sí la gravedad de la TH del infarto cerebral actuando por mecanismos independientes de su efecto sobre los linfocitos.
- 8) El Fingolimod no reduce la TH del ictus isquémico en condiciones de trombocitopenia.



## *BIBLIOGRAFÍA*



- Abeyasinghe, H. *et al.* (2016) 'Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 17(3), p. 288. doi: 10.3390/ijms17030288.
- Abilleira, S. *et al.* (2003) 'Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage.', *Journal of neurosurgery*, 99(1), pp. 65–70. doi: 10.3171/jns.2003.99.1.0065.
- Afshar-Kharghan, V. and Thiagarajan, P. (2006) 'Leukocyte adhesion and thrombosis.', *Current opinion in hematology*, 13(1), pp. 34–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319685> (Accessed: 14 February 2017).
- Akpan, N. and Troy, C. M. (2013) 'Caspase Inhibitors', *The Neuroscientist*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 19(2), pp. 129–136. doi: 10.1177/1073858412447875.
- Allen, C. L. and Bayraktutan, U. (2009) 'Oxidative Stress and Its Role in the Pathogenesis of Ischaemic Stroke', *International Journal of Stroke*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 4(6), pp. 461–470. doi: 10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x.
- Amaro, S. *et al.* (2007) 'A Pilot Study of Dual Treatment With Recombinant Tissue Plasminogen Activator and Uric Acid in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 38(7), pp. 2173–2175. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.480699.
- Amaro, S. *et al.* (2009) 'Course of matrix metalloproteinase-9 isoforms after the administration of uric acid in patients with acute stroke', *Journal of Neurology*, 256(4), pp. 651–656. doi: 10.1007/s00415-009-0153-6.
- Amaro, S. *et al.* (2015) 'Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human ischemic stroke', *Annals of Neurology*, 77(5), pp. 775–783. doi: 10.1002/ana.24378.
- Angelov, D. N. *et al.* (1998) 'The cerebral perivascular cells.', *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 147, pp. 1–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816725> (Accessed: 19 February 2017).
- Angiari, S. *et al.* (2013) 'Regulatory T cells suppress the late phase of the immune response in lymph nodes through P-selectin glycoprotein ligand-1.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(11), pp. 5489–500. doi: 10.4049/jimmunol.1301235.
- Anthony, D. C. *et al.* (1997) 'Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke.', *Neuropathology and applied neurobiology*, 23(5), pp. 406–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364466> (Accessed: 23 March 2017).
- Aoki, M. *et al.* (2016) 'Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential', *Mediators of Inflammation*, 2016, pp. 1–11. doi: 10.1155/2016/8606878.
- Arumugam, T. V, Granger, D. N. and Mattson, M. P. (2005) 'Stroke and T-Cells', *NeuroMolecular Medicine*, 229(7). doi: 10.1385/NMM:7:3:229.
- Asahi, M., Asahi, K., Wang, X., *et al.* (2000) 'Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(3), pp. 452–7. doi: 10.1097/00004647-200003000-00002.
- Asahi, M., Asahi, K., Jung, J., *et al.* (2000) 'Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94.', *Journal of*



---

*cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(12), pp. 1681–9. doi: 10.1097/00004647-200012000-00007.

Asahi, M. *et al.* (2001) 'Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), pp. 7724–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567062> (Accessed: 23 March 2017).

Awad, A. S. *et al.* (2006) 'Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney.', *American journal of physiology. Renal physiology*, 290(6), pp. F1516-24. doi: 10.1152/ajprenal.00311.2005.

Ayzenberg, I., Hoepner, R. and Kleiter, I. (2016) 'Fingolimod for multiple sclerosis and emerging indications: appropriate patient selection, safety precautions, and special considerations.', *Therapeutics and clinical risk management*. Dove Press, 12, pp. 261–72. doi: 10.2147/TCRM.S65558.

Baeten, K. M. and Akassoglou, K. (2011) 'Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke.', *Developmental neurobiology*. NIH Public Access, 71(11), pp. 1018–39. doi: 10.1002/dneu.20954.

Baird, T. A. *et al.* (2003) 'Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome.', *Stroke*, 34(9), pp. 2208–14. doi: 10.1161/01.STR.0000085087.41330.FF.

Bang, O. Y. *et al.* (2011) 'Collateral flow averts hemorrhagic transformation after endovascular therapy for acute ischemic stroke.', *Stroke*, 42(8), pp. 2235–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.604603.

Banwell, V., Sena, E. S. and Macleod, M. R. (2009) 'Systematic review and stratified meta-analysis of the efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke.', *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 18(4), pp. 269–76. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.11.009.

Bastide, M. *et al.* (2007) 'Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target.', *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier, 32 Suppl 1, pp. S36-9. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.03.015.

Bauer, A. T. *et al.* (2010) 'Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Hypoxia-Induced Vascular Leakage in the Brain via Tight Junction Rearrangement', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(4), pp. 837–848. doi: 10.1038/jcbfm.2009.248.

Becker, B. F. (1993) 'Towards the physiological function of uric acid', *Free Radical Biology and Medicine*, 14(6), pp. 615–631. doi: 10.1016/0891-5849(93)90143-I.

Becker, K. *et al.* (2001) 'Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats.', *Stroke*, 32(1), pp. 206–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136938> (Accessed: 9 March 2017).

Benakis, C. *et al.* (2016) 'Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal  $\gamma\delta$  T cells.', *Nature medicine*, 22(5), pp. 516–23. doi: 10.1038/nm.4068.

Berkhemer, O. A. *et al.* (2015) 'Stent-Retriever Thrombectomy for Stroke', *New England Journal of Medicine*, 373(11), pp. 1076–1078. doi: 10.1056/NEJMc1508744.

Biogen 2016 (no date) *Safety and Efficacy of Intravenous Natalizumab in Acute Ischemic Stroke - Full Text View - ClinicalTrials.gov, 2016*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02730455> (Accessed: 30 March 2017).

- Bochelen, D., Rudin, M. and Sauter, A. (1999) 'Calcineurin inhibitors FK506 and SDZ ASM 981 alleviate the outcome of focal cerebral ischemic/reperfusion injury.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 288(2), pp. 653–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918571> (Accessed: 15 March 2017).
- Bodhankar, S. *et al.* (2013) 'IL-10-producing B-cells limit CNS inflammation and infarct volume in experimental stroke', *Metabolic Brain Disease*, 28(3), pp. 375–386. doi: 10.1007/s11011-013-9413-3.
- Bowes, M. P. *et al.* (1995) 'Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy.', *Neurology*, 45(4), pp. 815–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723976> (Accessed: 9 March 2017).
- Braeuninger, S. and Kleinschnitz, C. (2009) 'Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems.', *Experimental & translational stroke medicine*. BioMed Central, 1, p. 8. doi: 10.1186/2040-7378-1-8.
- Brait, V. H. *et al.* (2010) 'Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30, pp. 1306–1317. doi: 10.1038/jcbfm.2010.14.
- Brait, V. H. *et al.* (2012) 'Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Nature Publishing Group, 32(4), pp. 598–611. doi: 10.1038/jcbfm.2012.6.
- Brait, V. H. *et al.* (2016) 'Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Agonist Is Protective Against Ischemia/Reperfusion in Mice', *Stroke*, 47(12), pp. 3053–3056. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015371.
- Brecht, S. *et al.* (2003) 'Changes in peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity and FK506 binding protein expression following neuroprotection by FK506 in the ischemic rat brain.', *Neuroscience*, 120(4), pp. 1037–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927209> (Accessed: 15 March 2017).
- Breckwoldt, M. O. *et al.* (2008) 'Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), pp. 18584–18589. doi: 10.1073/pnas.0803945105.
- Brinkmann, V. (2007) 'Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology', *Pharmacology & Therapeutics*, 115(1), pp. 84–105. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.04.006.
- Bruno, A. *et al.* (2002) 'Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial.', *Neurology*, 59(5), pp. 669–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221155> (Accessed: 23 January 2017).
- Buck, B. H. *et al.* (2008) 'Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke.', *Stroke*, 39(2), pp. 355–60. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490128.
- Campos, F. *et al.* (2013) 'Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 44(2), pp. 505–11. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.679043.
- Capes, S. E. *et al.* (2001) 'Stress Hyperglycemia and Prognosis of Stroke in Nondiabetic and Diabetic Patients', *Stroke*, 32(10).
- Carbone, F. *et al.* (2015) 'Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA)

- induces neutrophil degranulation in vitro via defined pathways.', *Vascular pharmacology*, 64, pp. 16–27. doi: 10.1016/j.vph.2014.11.007.
- Carden, D. L. and Granger, D. N. (2000) 'Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury', *The Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd., 190(3), pp. 255–266. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6.
- Castellanos, M. *et al.* (2007) 'Serum Cellular Fibronectin and Matrix Metalloproteinase-9 as Screening Biomarkers for the Prediction of Parenchymal Hematoma After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke: A Multicenter Confirmatory Study', *Stroke*, 38(6), pp. 1855–1859. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481556.
- Castilla-Guerra, L., Fernández-Moreno, M. C. and Hewitt, J. (2016) 'Tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con ictus agudo', *Revista Clínica Española*, 216(2), pp. 92–98. doi: 10.1016/j.rce.2015.06.005.
- Cervera, A. *et al.* (2004) 'Steady plasma concentration of unfractionated heparin reduces infarct volume and prevents inflammatory damage after transient focal cerebral ischemia in the rat', *Journal of Neuroscience Research*, 77(4), pp. 565–572. doi: 10.1002/jnr.20186.
- Cha, J.-K. *et al.* (2002) 'Surface expression of P-selectin on platelets is related with clinical worsening in acute ischemic stroke.', *Journal of Korean medical science*, 17(6), pp. 811–6. doi: 10.3346/jkms.2002.17.6.811.
- Chacko, B. K. *et al.* (2016) 'Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils.', *Redox biology*, 9, pp. 57–66. doi: 10.1016/j.redox.2016.06.003.
- Chamorro, A. *et al.* (2014) 'Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial.', *The Lancet. Neurology*, 13(5), pp. 453–60. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70054-7.
- Chamorro, Á. *et al.* (2016) 'Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation', *The Lancet Neurology*, 15, pp. 869–881. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00114-9.
- Chamorro, A., Urra, X. and Planas, A. M. (2007) 'Infection After Acute Ischemic Stroke: A Manifestation of Brain-Induced Immunodepression', *Stroke*, 38(3), pp. 1097–1103. doi: 10.1161/01.STR.0000258346.68966.9d.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) 'Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.', *Physiological reviews*, 59(3), pp. 527–605. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37532> (Accessed: 24 February 2017).
- Chiba, K. (2005) 'FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors.', *Pharmacology & therapeutics*, 108(3), pp. 308–19. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.05.002.
- Chintala, M. S., Bernardino, V. and Chiu, P. J. (1994) 'Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 271(3), pp. 1203–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996427> (Accessed: 16 March 2017).
- Chopp, M. *et al.* (1996) 'Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(4), pp. 578–84. doi: 10.1097/00004647-199607000-00007.

- Cipriani, R. *et al.* (2015) 'FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation.', *Journal of neuroinflammation*, 12(1), p. 86. doi: 10.1186/s12974-015-0308-6.
- Clark, A. W. *et al.* (1997) 'Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia.', *Neuroscience letters*, 238(1–2), pp. 53–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464653> (Accessed: 23 March 2017).
- Coelho, R. P. *et al.* (2007) 'The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 323(2), pp. 626–35. doi: 10.1124/jpet.107.123927.
- Colombo, E. *et al.* (2014) 'Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte nitric oxide.', *Annals of neurology*, 76(3), pp. 325–37. doi: 10.1002/ana.24217.
- Connolly, E. S. *et al.* (1996) 'Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke.', *The Journal of clinical investigation*, 97(1), pp. 209–16. doi: 10.1172/JCI118392.
- Connolly, E. S. *et al.* (1997) 'Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke.', *Circulation research*, 81(3), pp. 304–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285631> (Accessed: 7 March 2017).
- Copin, J.-C. and Gasche, Y. (2008) 'Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats.', *Brain research*, 1243, pp. 161–6. doi: 10.1016/j.brainres.2008.09.025.
- Coutinho, J. M. *et al.* (2016) 'Mechanical Thrombectomy for Stroke', *JAMA Neurology*, 37(10029), pp. 1723–1731. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3359.
- Crack, P. J. and Taylor, J. M. (2005) 'Reactive oxygen species and the modulation of stroke', *Free Radical Biology and Medicine*, 38(11), pp. 1433–1444. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.019.
- Cuadrado, E. *et al.* (2008) 'Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release', *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), pp. 207–214. doi: 10.1189/jlb.0907606.
- Cucchiara, B. *et al.* (1995) 'A risk score to predict intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke.', *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. Elsevier, 17(6), pp. 331–3. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.03.012.
- Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y. and Yemisci, M. (2011) 'Brain microvascular pericytes in health and disease', *Acta Neuropathologica*, 122(1), pp. 1–9. doi: 10.1007/s00401-011-0847-6.
- Deddens, L. H. *et al.* (2013) 'MRI of ICAM-1 Upregulation After Stroke: the Importance of Choosing the Appropriate Target-Specific Particulate Contrast Agent', *Molecular Imaging and Biology*, 15(4), pp. 411–422. doi: 10.1007/s11307-013-0617-z.
- Dejana, E. (1997) 'Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis.', *The Journal of clinical investigation*, 100(11 Suppl), pp. S7–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413393> (Accessed: 20 February 2017).
- Deogracias, R. *et al.* (2012) 'Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp. 14230–5. doi: 10.1073/pnas.1206093109.

- Dietrich, W. D., Busto, R. and Ginsberg, M. D. (1984) 'Cerebral endothelial microvilli: formation following global forebrain ischemia.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 43(1), pp. 72–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6693929> (Accessed: 6 March 2017).
- Ding, C., He, Q. and Li, P.-A. (2005) 'Diabetes increases expression of ICAM after a brief period of cerebral ischemia.', *Journal of neuroimmunology*, 161(1–2), pp. 61–7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.12.011.
- Dirnagl, U. (2012) 'Pathobiology of injury after stroke: The neurovascular unit and beyond', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1268(1), pp. 21–25. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06691.x.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A. (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view', *Trends Neurosci*, 22, pp. 391–397.
- Doi, Y. *et al.* (2013) 'Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons.', *PLoS one*. Edited by P. Fernandez-Funez, 8(4), p. e61988. doi: 10.1371/journal.pone.0061988.
- Dong, Y.-F. *et al.* (2018) 'S1PR3 is essential for phosphorylated fingolimod to protect astrocytes against oxygen-glucose deprivation-induced neuroinflammation via inhibiting TLR2/4-NF $\kappa$ B signalling.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(6), pp. 3159–3166. doi: 10.1111/jcmm.13596.
- Donnan, G. A. *et al.* (2008) 'Stroke', *Lancet*, 371, pp. 1612–23.
- Ducroux, C. *et al.* (2018) 'Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 49(3), pp. 754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896.
- Dusaban, S. S. *et al.* (2017) 'Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes.', *Journal of neuroinflammation*, 14(1), p. 111. doi: 10.1186/s12974-017-0882-x.
- Elkins, J. *et al.* (2017a) 'Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial.', *The Lancet. Neurology*, 16(3), pp. 217–226. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30357-X.
- Elkins, J. *et al.* (2017b) 'Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial.', *The Lancet. Neurology*, 16(3), pp. 217–226. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30357-X.
- Els, T. *et al.* (2002) 'Hyperglycemia in patients with focal cerebral ischemia after intravenous thrombolysis: influence on clinical outcome and infarct size.', *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 13(2), pp. 89–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867881> (Accessed: 23 January 2017).
- Eltzschig, H. K. and Collard, C. D. (2004) 'Vascular ischaemia and reperfusion injury', *British Medical Bulletin*, 70(70), pp. 71–86. doi: 10.1093/bmb/ldh025.
- Eltzschig, H. K. and Eckle, T. (2011) 'Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation.', *Nature medicine*. NIH Public Access, 17(11), pp. 1391–401. doi: 10.1038/nm.2507.
- Emsley, H. C. A. *et al.* (2005) 'A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(10), pp. 1366–1372. doi: 10.1136/jnnp.2004.054882.
- Endres, M. *et al.* (2008) 'Improving outcome after stroke: Overcoming the translational



- roadblock', *Cerebrovascular Diseases*, 25(3), pp. 268–278. doi: 10.1159/000118039.
- Engelhardt, B. and Liebner, S. (2014) 'Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier', *Cell and Tissue Research*, 355(3), pp. 687–699. doi: 10.1007/s00441-014-1811-2.
- Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators (2001a) 'Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial.', *Neurology*, 57(8), pp. 1428–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673584> (Accessed: 20 March 2017).
- Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators (2001b) 'Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial.', *Neurology*, 57(8), pp. 1428–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673584> (Accessed: 30 March 2017).
- Ergul, A. *et al.* (2009) 'Hyperglycemia, diabetes and stroke: Focus on the cerebrovasculature', *Vascular Pharmacology*, 51(1), pp. 44–49. doi: 10.1016/j.vph.2009.02.004.
- Fábián, G. *et al.* (1998) 'Expression of G-protein subtypes in cultured cerebral endothelial cells.', *Neurochemistry international*, 33(2), pp. 179–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761462> (Accessed: 19 February 2017).
- Fabian, R. H., DeWitt, D. S. and Kent, T. A. (1995) 'In vivo detection of superoxide anion production by the brain using a cytochrome c electrode.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15(2), pp. 242–7. doi: 10.1038/jcbfm.1995.30.
- Fabian, R. H. and Kent, T. A. (2012) 'Hyperglycemia accentuates persistent &quot;functional uncoupling&quot; of cerebral microvascular nitric oxide and superoxide following focal ischemia/reperfusion in rats.', *Translational stroke research*, 3(4), pp. 482–90. doi: 10.1007/s12975-012-0210-9.
- Fabry, Z. *et al.* (1993) 'Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes.', *Journal of neuroimmunology*, 47(1), pp. 23–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376546> (Accessed: 19 February 2017).
- Fagan, S. C. *et al.* (2003) 'Hemorrhagic transformation is related to the duration of occlusion and treatment with tissue plasminogen activator in a nonembolic stroke model.', *Neurological research*, 25(4), pp. 377–82. doi: 10.1179/016164103101201526.
- Fagan, S. C. *et al.* (2013) 'Recommendations for Preclinical Research in Hemorrhagic Transformation', *Tranl Stroke Res*, 4(3), pp. 322–327. doi: 10.1126/scisignal.2001449.Engineering.
- Feigin, V. L. *et al.* (2014) 'Global burden of stroke: an underestimate – Authors' reply', *The Lancet*, 383(9924), pp. 1205–1206. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60596-1.
- Feng, S. *et al.* (2011) 'Edaravone for acute ischaemic stroke', in Liu, M. (ed.) *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. CD007230. doi: 10.1002/14651858.CD007230.pub2.
- Fernandez-Patron, C. *et al.* (2001) 'Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]', *The FASEB Journal*, 15(12), pp. 2230–2240. doi: 10.1096/fj.01-0178com.
- Ferrer, I. and Planas, A. M. (2003) 'Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(4).



- Fisher, M. *et al.* (2009) 'Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(6), pp. 2244–50. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
- Florczak-Rzepka, M. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: An update', *Cerebrovascular Diseases*, 34(4), pp. 249–262. doi: 10.1159/000341686.
- Frijns, C. J. M. and Kappelle, L. J. (2002) 'Inflammatory Cell Adhesion Molecules in Ischemic Cerebrovascular Disease', *Stroke*, 33(8).
- Fu, Y. *et al.* (2014) 'Impact of an immune modulator fingolimod on acute ischemic stroke', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), pp. 18315–18320. doi: 10.1073/pnas.1416166111.
- Furuya, K. *et al.* (2001) 'Examination of several potential mechanisms for the negative outcome in a clinical stroke trial of enlimomab, a murine anti-human intercellular adhesion molecule-1 antibody: a bedside-to-bench study.', *Stroke*, 32(11), pp. 2665–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11692032> (Accessed: 30 March 2017).
- Garcia-Yebenes, I. *et al.* (2011) 'A Mouse Model of Hemorrhagic Transformation by Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration After In Situ Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 42(1), pp. 196–203. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.600452.
- Garcia, J. G. *et al.* (2001) 'Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement.', *The Journal of clinical investigation*, 108(5), pp. 689–701. doi: 10.1172/JCI12450.
- Gardell, S. E., Dubin, A. E. and Chun, J. (2006) 'Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling.', *Trends in molecular medicine*, 12(2), pp. 65–75. doi: 10.1016/j.molmed.2005.12.001.
- Gasche, Y. *et al.* (2006) 'Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11(February), pp. 1289–301. doi: 1883 [pii].
- Gautier, S. *et al.* (2009) 'Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia.', *British journal of pharmacology*, 156(4), pp. 673–9. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00068.x.
- Gelderblom, M. *et al.* (2012) 'Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke', *Blood*, 120(18), pp. 3793–3802. doi: 10.1182/blood-2012-02-412726.
- Giannotta, M., Trani, M. and Dejana, E. (2013) 'VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity', *Developmental Cell*, 26(5), pp. 441–454. doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.
- Gidday, J. M. *et al.* (2005a) 'Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(2), pp. H558-68. doi: 10.1152/ajpheart.01275.2004.
- Gidday, J. M. *et al.* (2005b) 'Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(2), pp. H558-68. doi: 10.1152/ajpheart.01275.2004.

- Glantzounis, G. K. *et al.* (2005) 'Uric acid and oxidative stress.', *Current pharmaceutical design*, 11(32), pp. 4145–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375736> (Accessed: 29 March 2017).
- Gliem, M. *et al.* (2012) 'Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models', *Annals of Neurology*, 71(6), pp. 743–752. doi: 10.1002/ana.23529.
- Go, A. S. *et al.* (2014) 'Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association.', *Circulation*, 129(3), pp. e28–e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80.
- Goussev, A. V *et al.* (1998) 'P-selectin antibody reduces hemorrhage and infarct volume resulting from MCA occlusion in the rat.', *Journal of the neurological sciences*. Elsevier, 161(1), pp. 16–22. doi: 10.1016/S0022-510X(98)00262-7.
- Goyal, M. *et al.* (2016) 'Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials.', *Lancet (London, England)*, 387(10029), pp. 1723–31. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
- Granger, D. N. and Kvietys, P. R. (2015) 'Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept.', *Redox biology*. Elsevier, 6, pp. 524–51. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.
- Groves, A., Kihara, Y. and Chun, J. (2013) 'Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy.', *Journal of the neurological sciences*, 328(1–2), pp. 9–18. doi: 10.1016/j.jns.2013.02.011.
- Grupke, S. *et al.* (2015) 'Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: From review to preview', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 129, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.11.013.
- Gu, L. *et al.* (2015) 'T Cells and Cerebral Ischemic Stroke', *Neurochemical Research*. Springer US, 40(9), pp. 1786–1791. doi: 10.1007/s11064-015-1676-0.
- Gulino-Debrac, D. (2013) 'Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function.', *Tissue barriers*. Taylor & Francis, 1(2), p. e24180. doi: 10.4161/tisb.24180.
- Gurney, K. J., Estrada, E. Y. and Rosenberg, G. A. (2006) 'Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation.', *Neurobiology of disease*, 23(1), pp. 87–96. doi: 10.1016/j.nbd.2006.02.006.
- Haberman, F. *et al.* (2007) 'Soluble neuroprotective antioxidant uric acid analogs ameliorate ischemic brain injury in mice.', *Neuromolecular medicine*, 9(4), pp. 315–23. doi: 10.1007/s12017-007-8010-1.
- Hall, C. N. *et al.* (2014) 'Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease', *Nature*, 508(7494), pp. 55–60. doi: 10.1038/nature13165.
- Harada, J. *et al.* (2004) 'Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells.', *Journal of neurochemistry*, 88(4), pp. 1026–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756825> (Accessed: 31 March 2017).
- Harris, T. J. C. and Tepass, U. (2010) 'Adherens junctions: from molecules to morphogenesis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(7), pp. 502–514. doi: 10.1038/nrm2927.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) 'The Blood-Brain Barrier / Neurovascular Unit in Health and Disease', *Pharmacological reviews*, 57(2), pp. 173–185. doi: 10.1124/pr.57.2.4.173.

- Heindl, B. *et al.* (1998) 'Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischaemic hearts.', *Cardiovascular research*, 38(2), pp. 383–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709399> (Accessed: 16 March 2017).
- Henning, E. C., Latour, L. L. and Warach, S. (2008) 'Verification of Enhancement of the CSF Space, not Parenchyma, in Acute Stroke Patients with Early Blood—Brain Barrier Disruption', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(5), pp. 882–886. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600598.
- Heo, J. H. *et al.* (1999) 'Matrix Metalloproteinases Increase Very Early During Experimental Focal Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(6), pp. 624–633. doi: 10.1097/00004647-199906000-00005.
- Ho-Tin-Noé, B., Demers, M. and Wagner, D. (2011) 'How platelets safeguard vascular integrity', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, pp. 56–65. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x.
- Hofmann, U. *et al.* (2009) 'Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia-reperfusion.', *Cardiovascular research*, 83(2), pp. 285–93. doi: 10.1093/cvr/cvp137.
- Howells, D. W., Sena, E. S. and Macleod, M. R. (2014) 'Bringing rigour to translational medicine.', *Nature reviews. Neurology*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 37–43. doi: 10.1038/nrneurol.2013.232.
- Huang, J. *et al.* (2000) 'Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke.', *Stroke*, 31(12), pp. 3047–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11108771> (Accessed: 7 March 2017).
- Huang, J., Upadhyay, U. M. and Tamargo, R. J. (2006) 'Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia', *Surgical Neurology*, 66(3), pp. 232–245. doi: 10.1016/j.surneu.2005.12.028.
- Hunter, S. F., Bowen, J. D. and Reder, A. T. (2016) 'The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis', *CNS Drugs*, 30(2), pp. 135–147. doi: 10.1007/s40263-015-0297-0.
- Hurn, P. D. *et al.* (2007) 'T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(11), pp. 1798–805. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600482.
- Huwiler, A. and Pfeilschifter, J. (2008) 'New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets.', *Biochemical pharmacology*, 75(10), pp. 1893–900. doi: 10.1016/j.bcp.2007.12.018.
- Iadecola, C. and Alexander, M. (2001) 'Cerebral ischemia and inflammation.', *Current opinion in neurology*, 14(1), pp. 89–94. doi: 10.1097/00019052-200102000-00014.
- Iadecola, C. and Anrather, J. (2011) 'The immunology of stroke: from mechanisms to translation', *Nat Med*. Nature Publishing Group, 17(7), pp. 796–808. doi: 10.1038/nm.2399.
- ILL-Raga, G. *et al.* (2015) 'Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.12.007.
- Infante-Duarte, C. *et al.* (2008) 'New developments in understanding and treating neuroinflammation', *Journal of Molecular Medicine*, 86(9), pp. 975–985. doi: 10.1007/s00109-007-0292-0.

- Inzitari, D. *et al.* (2013) 'MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death.', *Stroke*, 44(10), pp. 2901–3. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002274.
- Iwasaki, Y. *et al.* (2007) 'High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro.', *Journal of diabetes and its complications*, 21(1), pp. 56–62. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2006.02.001.
- Jafar, J. J. *et al.* (1989) 'Selective platelet deposition during focal cerebral ischemia in cats.', *Stroke*, 20(5), pp. 664–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2718207> (Accessed: 9 March 2017).
- Jickling, G. C. *et al.* (2014) 'Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Nature Publishing Group, 34(2), pp. 185–99. doi: 10.1038/jcbfm.2013.203.
- Jin, R., Yang, G. and Li, G. (2010) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 87(5), pp. 779–789. doi: 10.1189/jlb.1109766.
- Jin, Y.-J. *et al.* (2002) 'Combined argatroban and edaravone caused additive neuroprotection against 15 min of forebrain ischemia in gerbils.', *Neuroscience research*, 43(1), pp. 75–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074843> (Accessed: 28 March 2017).
- Johnson, W. *et al.* (2016) 'Stroke: a global response is needed', *Bull World Health Organ*, 94, p. 634–634A. doi: 10.2471/BLT.16.181636.
- Jovin, T. G. *et al.* (2015) 'Thrombectomy within 8 Hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 372(24), pp. 2296–2306. doi: 10.1056/NEJMoa1503780.
- Justicia, C. *et al.* (2003) 'Neutrophil Infiltration Increases Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain after Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, pp. 1430–1440. doi: 10.1097/01.WCB.0000090680.07515.C8.
- Justicia, C. *et al.* (2006) 'Anti-VCAM-1 Antibodies did not Protect against Ischemic Damage Either in Rats Or in Mice', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(3), pp. 421–432. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600198.
- Kamada, H. *et al.* (2007) 'Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction.', *Stroke*, 38(3), pp. 1044–9. doi: 10.1161/01.STR.0000258041.75739.cb.
- Kamel, H. and Iadecola, C. (2012) 'Brain-Immune Interactions and Ischemic Stroke', *Archives of Neurology*, 69(5), p. 576. doi: 10.1001/archneurol.2011.3590.
- Kanemoto, Y. *et al.* (2002) 'Effects of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on reperfusion injury induced by late reperfusion in the rat middle cerebral artery occlusion model.', *Neurosurgery*, 51(4), pp. 1034–41; discussion 1041–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234414> (Accessed: 7 March 2017).
- Kassner, A. and Merali, Z. (2015) 'Assessment of Blood–Brain Barrier Disruption in Stroke', *Stroke*, 46(11), pp. 3310–3315. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008861.

- Kaste, M. *et al.* (2013) 'Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MCI-186 in Patients with Acute Ischemic Stroke: New Formulation and Dosing Regimen', *Cerebrovascular Diseases*, 36(3), pp. 196–204. doi: 10.1159/000353680.
- Kawai, H. *et al.* (1997) 'Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 281(2), pp. 921–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152402> (Accessed: 28 March 2017).
- Khandelwal, P., Yavagal, D. R. and Sacco, R. L. (2016) 'Acute Ischemic Stroke Intervention.', *Journal of the American College of Cardiology*, 67(22), pp. 2631–44. doi: 10.1016/j.jacc.2016.03.555.
- Khatri, R. *et al.* (2012a) 'Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke.', *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins, 79(13 Suppl 1), pp. S52–7. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70.
- Khatri, R. *et al.* (2012b) 'Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke.', *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins, 79(13 Suppl 1), pp. S52–7. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70.
- Kikuchi, K. *et al.* (2013) 'Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, is a potentially useful addition to thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke.', *Biomedical reports*. Spandidos Publications, 1(1), pp. 7–12. doi: 10.3892/br.2012.7.
- Kleinschnitz, C. *et al.* (2010) 'Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation', *Blood*, 115(18), pp. 3835–42. doi: 10.1182/blood-2009-10-249078.
- Kolahdooz, Z. *et al.* (2015) 'Sphingosin-1-phosphate Receptor 1: a Potential Target to Inhibit Neuroinflammation and Restore the Sphingosin-1-phosphate Metabolism.', *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 42(3), pp. 195–202. doi: 10.1017/cjn.2015.19.
- Kraft, P. *et al.* (2013) 'FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection', *Stroke*, 44(11), pp. 3202–3210. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002880.
- Krueger, M. *et al.* (2015) 'Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(2), pp. 292–303. doi: 10.1038/jcbfm.2014.199.
- Kruyt, N. D. *et al.* (2010) 'Hyperglycemia in acute ischemic stroke: pathophysiology and clinical management', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 6(3), pp. 145–155. doi: 10.1038/nrneurol.2009.231.
- Kunimatsu, T. *et al.* (2009) 'Measurement of cerebral reactive hyperemia at the initial post-ischemia reperfusion stage under normothermia and moderate hypothermia in rats.', *Journal of oral science*, 51(4), pp. 615–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032616> (Accessed: 6 March 2017).
- Kuroiwa, T. *et al.* (1985) 'The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 68(2), pp. 122–129. doi: 10.1007/BF00688633.
- Kurose, I. *et al.* (1994) 'Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage.', *Circulation research*, 74(2), pp. 336–43. Available at:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507416> (Accessed: 4 April 2017).
- Lakhan, S. E. *et al.* (2009) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, 7(1), p. 97. doi: 10.1186/1479-5876-7-97.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A. and Hofer, M. (2009) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches.', *Journal of translational medicine*, 7, p. 97. doi: 10.1186/1479-5876-7-97.
- Lalor, P. and Nash, G. B. (1995) 'Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets.', *British journal of haematology*, 89(4), pp. 725–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539623> (Accessed: 30 August 2018).
- Lapchak, P. A. *et al.* (2000) 'Metalloproteinase Inhibition Reduces Thrombolytic (Tissue Plasminogen Activator)-Induced Hemorrhage After Thromboembolic Stroke Editorial Comment', *Stroke*, 31(12), pp. 3034–3040. doi: 10.1161/01.STR.31.12.3034.
- Lapchak, P. A. *et al.* (2002) 'Effects of the spin trap agent disodium- [tert-butylimino)methyl]benzene-1,3-disulfonate N-oxide (generic NXY-059) on intracerebral hemorrhage in a rabbit Large clot embolic stroke model: combination studies with tissue plasminogen activator.', *Stroke*, 33(6), pp. 1665–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053009> (Accessed: 24 March 2017).
- Lapchak, P. A. (2010) 'A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy?', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(10), pp. 1753–1763. doi: 10.1517/14656566.2010.493558.
- Lees, K. R. *et al.* (2006) 'NXY-059 for Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 354(6), pp. 588–600. doi: 10.1056/NEJMoa052980.
- Lees, K. R. *et al.* (2010) 'Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials.', *Lancet (London, England)*, 375(9727), pp. 1695–703. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60491-6.
- Ley, K. and Kansas, G. S. (2004) 'Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation', *Nature Reviews Immunology*, 4(5), pp. 325–336. doi: 10.1038/nri1351.
- Li, N. (2008) 'Platelet-lymphocyte cross-talk.', *Journal of leukocyte biology*. Society for Leukocyte Biology, 83(5), pp. 1069–78. doi: 10.1189/jlb.0907615.
- Li, W., Xu, H. and Testai, F. D. (2016) 'Mechanism of Action and Clinical Potential of Fingolimod for the Treatment of Stroke.', *Frontiers in neurology*. Frontiers Media SA, 7, p. 139. doi: 10.3389/fneur.2016.00139.
- Li, Y.-J. *et al.* (2015) 'Fingolimod alters inflammatory mediators and vascular permeability in intracerebral hemorrhage.', *Neuroscience bulletin*, 31(6), pp. 755–62. doi: 10.1007/s12264-015-1532-2.
- Liesz, A. *et al.* (2009) 'Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke', *Nature Medicine*, 15(2), pp. 192–199. doi: 10.1038/nm.1927.
- Liesz, A. *et al.* (2011) 'Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke', *Brain*, 134(3), pp. 704–720. doi: 10.1093/brain/awr008.
- Lin, B. *et al.* (2000) 'Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats.', *Neuroscience letters*, 278(1–2), pp. 1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643786> (Accessed: 4 April 2017).



- Liu, J. *et al.* (2013) 'Systematic review and meta-analysis of the efficacy of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 (fingolimod) in animal models of stroke.', *The International journal of neuroscience*, 123(3), pp. 163–9. doi: 10.3109/00207454.2012.749255.
- Liu, Y. *et al.* (2000) 'Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation.', *The Journal of clinical investigation*, 106(8), pp. 951–61. doi: 10.1172/JCI10905.
- Llovera, G., Hofmann, K., Roth, S., Salas-Perdomo, A., Ferrer-Ferrer, M., Perego, C., Zanier, E. R., *et al.* (2015) 'Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia', *Science Translational Medicine*, 7(299). doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9853.
- Llovera, G., Hofmann, K., Roth, S., Salas-Perdomo, A., Ferrer-Ferrer, M., Perego, C., Zanier, E. R., *et al.* (2015) 'Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia', *Science Translational Medicine*, 7(299), p. 299ra121-299ra121. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9853.
- Lull, L. *et al.* (2015) 'Uric Acid Therapy Improves Clinical Outcome in Women With Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 46(8). doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009960.
- Lo, E. H., Dalkara, T. and Moskowitz, M. A. (2003) 'Mechanisms, challenges and opportunities in stroke', *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5), pp. 399–414. doi: 10.1038/nrn1106.
- Longa, E. *et al.* (1989) 'Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 20(1), pp. 84–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2643202> (Accessed: 19 September 2016).
- Lopez, A. D. *et al.* (2006) 'Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data.', *Lancet (London, England)*. Elsevier, 367(9524), pp. 1747–57. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68770-9.
- Lu, A. *et al.* (2008) 'Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury.', *Experimental neurology*, 210(2), pp. 549–59. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.003.
- Lu, A. *et al.* (2009) 'Mechanical reperfusion is associated with post-ischemic hemorrhage in rat brain', *Experimental Neurology*. Elsevier B.V., 216(2), pp. 407–412. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.12.020.
- Lu, L. *et al.* (2014) 'Fingolimod exerts neuroprotective effects in a mouse model of intracerebral hemorrhage.', *Brain research*. NIH Public Access, 1555, pp. 89–96. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.048.
- Luitse, M. J. A. *et al.* (2012) 'Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke.', *The Lancet. Neurology*. Elsevier, 11(3), pp. 261–71. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70005-4.
- Ma, Y. H. *et al.* (2012) 'Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress.', *Neurochemistry international*, 60(5), pp. 475–83. doi: 10.1016/j.neuint.2012.01.029.
- MacDougall, N. J. J. and Muir, K. W. (2011) 'Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(3), pp. 807–18. doi: 10.1038/jcbfm.2010.210.
- Mackay, J. and Mensah, G. A. (2004) *The atlas of heart disease and stroke*, World Health Organization.
- Macleod, M. R. *et al.* (2008) 'Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal

- cerebral ischaemia is confounded by study quality.', *Stroke*, 39(10), pp. 2824–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.515957.
- Maestrini, I. *et al.* (2015) 'Higher neutrophil counts before thrombolysis for cerebral ischemia predict worse outcomes', *Neurology*, 85(16), pp. 1408–1416. doi: 10.1212/WNL.0000000000002029.
- Maier, C. M. *et al.* (2006) 'Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage', *Annals of Neurology*, 59(6), pp. 929–938. doi: 10.1002/ana.20850.
- Mandala, S. *et al.* (2002) 'Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists', *Science*, 296(5566), pp. 346–349. doi: 10.1126/science.1070238.
- Mao, L. *et al.* (2017) 'Regulatory T cells ameliorate tissue plasminogen activator-induced brain haemorrhage after stroke.', *Brain: a journal of neurology*, 140(7), pp. 1914–1931. doi: 10.1093/brain/awx111.
- Margaill, I., Plotkine, M. and Lerouet, D. (2005) 'Antioxidant strategies in the treatment of stroke', *Free Radical Biology and Medicine*, 39(4), pp. 429–443. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.003.
- Martín, A. *et al.* (2006) 'Why Does Acute Hyperglycemia Worsen the Outcome of Transient Focal Cerebral Ischemia?', *Stroke*, 37(5).
- Martínez-Vila, E. *et al.* (2011) 'Enfermedades cerebrovasculares', *Medicine*, 10(72), pp. 4871–4881. doi: 10.1016/S0304-5412(11)70024-5.
- Matsumoto, K. *et al.* (1996) 'Secondary Elevation of Extracellular Neurotransmitter Amino Acids in the Reperfusion Phase Following Focal Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(1), pp. 114–124. doi: 10.1097/00004647-199601000-00014.
- McCabe, D. J. H. *et al.* (2005) 'Increased platelet count and leucocyte-platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(9), pp. 1249–1254. doi: 10.1136/jnnp.2004.051003.
- Merchant, S. H., Gurule, D. M. and Larson, R. S. (2003) 'Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(4), pp. H1260–H1268. doi: 10.1152/ajpheart.00840.2002.
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U. and Meisel, A. (2004) 'Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models', *Metabolic Brain Disease*, 19(3–4), pp. 151–167. doi: 10.1023/B:MEBR.0000043966.46964.e6.
- De Meyer, S. F. *et al.* (2016) 'Thromboinflammation in Stroke Brain Damage', *Stroke*, 47(4), pp. 1165–1172. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011238.
- Michalski, D. *et al.* (2012) 'Interrelations between blood-brain barrier permeability and matrix metalloproteinases are differently affected by tissue plasminogen activator and hyperoxia in a rat model of embolic stroke.', *Medical gas research*, 2(2).
- Mies, G., Iijima, T. and Hossmann, K. A. (1993) 'Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat.', *Neuroreport*, 4(6), pp. 709–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8347812> (Accessed: 7 February 2017).
- Miller, D. W. (1999) 'Immunobiology of the blood-brain barrier.', *Journal of neurovirology*, 5(January 2000), pp. 570–578. doi: 10.3109/13550289909021286.
- Miró-Mur, F. *et al.* (2016) 'Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain

- differentiate into macrophages with features of alternative activation', *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, pp. 18–33. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.010.
- Miró-Mur, F. *et al.* (2018) 'Adrenal hormones and circulating leukocyte subtypes in stroke patients treated with reperfusion therapy.', *Brain, behavior, and immunity*, 70, pp. 346–353. doi: 10.1016/j.bbi.2018.03.018.
- Miron, V. E. *et al.* (2008) 'FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival.', *Annals of neurology*, 63(1), pp. 61–71. doi: 10.1002/ana.21227.
- Mitsios, N. *et al.* (2006) 'Pathophysiology of acute ischaemic stroke: An analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets', *Pathobiology*, 73(4), pp. 159–175. doi: 10.1159/000096017.
- Mocco, J. *et al.* (2002) 'HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke.', *Circulation research*, 91(10), pp. 907–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433835> (Accessed: 7 March 2017).
- Molina, C. A. *et al.* (2001) 'Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke.', *Stroke*, 32(5), pp. 1079–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340213> (Accessed: 24 March 2017).
- Montaner, J. *et al.* (2003) 'Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke.', *Circulation*, 107(4), pp. 598–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566373> (Accessed: 23 March 2017).
- Mosimann, P. J. *et al.* (2013) 'Is intracerebral hemorrhage a time-dependent phenomenon after successful combined intravenous and intra-arterial therapy?', *Stroke*, 44(3), pp. 806–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.675678.
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H. and Iadecola, C. (2010) 'The science of stroke: mechanisms in search of treatments.', *Neuron*, 67(2), pp. 181–98. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.002.
- Mracsko, E. *et al.* (2014) 'Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic–pituitary–adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke', *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, pp. 200–209. doi: 10.1016/j.bbi.2014.05.015.
- Nadareishvili, Z. G. *et al.* (2004) 'Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death.', *Neurology*, 63(8), pp. 1446–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505163> (Accessed: 13 March 2017).
- Nakano, Y. *et al.* (2008) 'Platelet Dynamics in the Early Phase of Postischemic Liver In Vivo', *Journal of Surgical Research*, 149(2), pp. 192–198. doi: 10.1016/j.jss.2007.09.016.
- Neuhaus, A. A. *et al.* (2014) 'Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke.', *JAMA neurology*, 71(5), pp. 634–9. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6299.
- Nieswandt, B., Kleinschnitz, C. and Stoll, G. (2011a) 'Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease?', *The Journal of Physiology*. Blackwell Publishing Ltd, 589(17), pp. 4115–4123. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212886.
- Nieswandt, B., Kleinschnitz, C. and Stoll, G. (2011b) 'Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd, 9(s1), pp. 92–104. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x.

- Nieswandt, B. and Stoll, G. (2013) '(Dis)solving the stroke problem by vWF inhibition?', *Blood*, 121(25), pp. 4972–4974. doi: 10.1182/blood-2013-05-498725.
- Nishi, H. *et al.* (1989) 'Effect of MCI-186 on brain edema in rats.', *Stroke*, 20(9), pp. 1236–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2505409> (Accessed: 28 March 2017).
- Nito, C. *et al.* (2003) 'The neuroprotective effect of a free radical scavenger and mild hypothermia following transient focal ischemia in rats.', *Acta neurochirurgica. Supplement*, 86, pp. 199–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753435> (Accessed: 28 March 2017).
- Noda, H. *et al.* (2013) 'Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia.', *Journal of neuroimmunology*, 256(1–2), pp. 13–8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.12.005.
- Nour, M., Scalzo, F. and Liebeskind, D. S. (2013) 'Ischemia-reperfusion injury in stroke.', *Interventional neurology*. Karger Publishers, 1(3–4), pp. 185–99. doi: 10.1159/000353125.
- Nussbaum, C. *et al.* (2015) 'Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin.', *Nature communications*, 6(1), p. 6416. doi: 10.1038/ncomms7416.
- Offner, H. and Hurn, P. D. (2012) 'A novel hypothesis: regulatory B lymphocytes shape outcome from experimental stroke.', *Translational stroke research*. NIH Public Access, 3(3), pp. 324–30. doi: 10.1007/s12975-012-0187-4.
- Ogata, Y., Enghild, J. J. and Nagase, H. (1992) 'Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9.', *The Journal of biological chemistry*, 267(6), pp. 3581–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371271> (Accessed: 23 March 2017).
- Olmez, I. and Ozyurt, H. (2012) 'Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease', *Neurochemistry International*, 60(2), pp. 208–212. doi: 10.1016/j.neuint.2011.11.009.
- Omi, H. *et al.* (2002) 'Participation of high glucose concentrations in neutrophil adhesion and surface expression of adhesion molecules on cultured human endothelial cells: effect of antidiabetic medicines.', *Journal of diabetes and its complications*, 16(3), pp. 201–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015189> (Accessed: 4 April 2017).
- Onetti, Y. *et al.* (2015) 'Middle cerebral artery remodeling following transient brain ischemia is linked to early postischemic hyperemia: a target of uric acid treatment.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 308(8), pp. H862–74. doi: 10.1152/ajpheart.00001.2015.
- Paciaroni, M. *et al.* (2015) 'Early Recurrence and Cerebral Bleeding in Patients With Acute Ischemic Stroke and Atrial Fibrillation', *Stroke*, 46(8), pp. 2175–2182. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008891.
- Pan, J. *et al.* (2007) 'Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies.', *Neuroradiology*. Springer, 49(2), pp. 93–102. doi: 10.1007/s00234-006-0183-z.
- Panés, J. *et al.* (1996) 'Diabetes Exacerbates Inflammatory Responses to Ischemia-Reperfusion', *Circulation*, 93(1).
- Pantoni, L., Sarti, C. and Inzitari, D. (1998) 'Cytokines and Cell Adhesion Molecules in Cerebral Ischemia', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(4).
- Papadopoulos, N., Yiallouras, C. and Damianou, C. (2016) 'The Enhancing Effect of Focused

- Ultrasound on TNK-Tissue Plasminogen Activator-Induced Thrombolysis Using an In Vitro Circulating Flow Model', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.052.
- Park, S.-J. and Im, D.-S. (2017) 'Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators and Drug Discovery.', *Biomolecules & therapeutics*. Korean Society of Applied Pharmacology, 25(1), pp. 80–90. doi: 10.4062/biomolther.2016.160.
- Peisker, T. *et al.* (2016) 'Acute stroke therapy: A review', *Trends in Cardiovascular Medicine*. doi: 10.1016/j.tcm.2016.06.009.
- Peppiatt, C. M. *et al.* (2006) 'Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes', *Nature*, 443(7112), pp. 700–704. doi: 10.1038/nature05193.
- Pérez-Asensio, F. J. *et al.* (2010) 'Antioxidant CR-6 protects against reperfusion injury after a transient episode of focal brain ischemia in rats.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications, 30(3), pp. 638–52. doi: 10.1038/jcbfm.2009.237.
- Perez-de-Puig, I. *et al.* (2015) 'Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke', *Acta Neuropathologica*, 129(2), pp. 239–257. doi: 10.1007/s00401-014-1381-0.
- Petty, M. A. and Lo, E. H. (2002) 'Junctional complexes of the blood-brain barrier: Permeability changes in neuroinflammation', *Progress in Neurobiology*, 68(5), pp. 311–323. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00128-4.
- Pharmaphorum 2018 (no date) *Tysabri failure in stroke a setback for Biogen*. Available at: <https://pharmaphorum.com/news/tysabri-failure-stroke-setback-biogen/> (Accessed: 19 September 2018).
- Phillis, J. W. *et al.* (2002) 'Effects of immunosuppressants, calcineurin inhibition, and blockade of endoplasmic reticulum calcium channels on free fatty acid efflux from the ischemic/reperfused rat cerebral cortex.', *Brain research*, 957(1), pp. 12–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443975> (Accessed: 15 March 2017).
- Planas, A. M. *et al.* (2002) 'Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(8), pp. 918–25. doi: 10.1097/00004647-200208000-00003.
- Pocock, J. M. and Kettenmann, H. (2007) 'Neurotransmitter receptors on microglia', *Trends in Neurosciences*, 30(10), pp. 527–535. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007.
- Polak, J. F. (2004) 'Ultrasound energy and the dissolution of thrombus.', *The New England journal of medicine*, 351(21), pp. 2154–5. doi: 10.1056/NEJMp048249.
- Powers, W. J. *et al.* (2018) '2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 49(3), pp. e46–e99. doi: 10.1161/STR.000000000000158.
- Prass, K. *et al.* (2003) 'Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation.', *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp. 725–36. doi: 10.1084/jem.20021098.



- Prestigiacomo, C. J. *et al.* (1999) 'CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke.', *Stroke*, 30(5), pp. 1110–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229752> (Accessed: 9 March 2017).
- Price, C. J. S. *et al.* (2004) 'Cerebral Neutrophil Recruitment, Histology, and Outcome in Acute Ischemic Stroke: An Imaging-Based Study', *Stroke*, 35(7), pp. 1659–1664. doi: 10.1161/01.STR.0000130592.71028.92.
- Pryor, W. A. and Squadrito, G. L. (1995) 'The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide.', *The American journal of physiology*, 268(5 Pt 1), pp. L699–722. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762673> (Accessed: 24 February 2017).
- Qin, C. *et al.* (2017) 'Fingolimod Protects Against Ischemic White Matter Damage by Modulating Microglia Toward M2 Polarization via STAT3 Pathway.', *Stroke*, 48(12), pp. 3336–3346. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.018505.
- Renú, A. *et al.* (2017) 'Vessel Wall Enhancement and Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier Disruption After Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 48(3), pp. 651–657. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015648.
- Reynolds, J. M. and McDonagh, P. F. (1994) 'Platelets do not modulate leukocyte-mediated coronary microvascular damage during early reperfusion.', *The American journal of physiology*, 266(1 Pt 2), pp. H171–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304497> (Accessed: 16 March 2017).
- Ribo, M. *et al.* (2007) 'Hyperglycemia during ischemia rapidly accelerates brain damage in stroke patients treated with tPA.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(9), pp. 1616–22. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600460.
- Robbins, N. M. and Swanson, R. A. (2014) 'Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism.', *Stroke*. NIH Public Access, 45(6), pp. 1881–6. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.004889.
- Robinson, R. G. *et al.* (1975) 'Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour.', *Nature*, 255(5506), pp. 332–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1128692> (Accessed: 19 September 2016).
- Rodrigues, S. F. and Granger, D. N. (2010) 'Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure.', *Cardiovascular research*. Oxford University Press, 87(2), pp. 291–9. doi: 10.1093/cvr/cvq090.
- Rodrigues, S. F. and Granger, D. N. (2015) 'Blood cells and endothelial barrier function', *Tissue Barriers*, 3(1–2), p. e978720. doi: 10.4161/21688370.2014.978720.
- Rodriguez-Yanez, M. *et al.* (2006) 'New-onset hypertension and inflammatory response/poor outcome in acute ischemic stroke', *Neurology*, 67(11), pp. 1973–1978. doi: 10.1212/01.wnl.0000247064.53130.91.
- Rolland, W. B. *et al.* (2011) 'FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice.', *Acta neurochirurgica. Supplement*, 111, pp. 213–7. doi: 10.1007/978-3-7091-0693-8\_36.
- Rolland, W. B. *et al.* (2013) 'Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage.', *Experimental neurology*. NIH Public Access, 241, pp. 45–55. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.12.009.



- Romanos, E. *et al.* (2007) 'Uric Acid Reduces Brain Damage and Improves the Benefits of rt-PA in a Rat Model of Thromboembolic Stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(1), pp. 14–20. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600312.
- Rosell, A. *et al.* (2006) 'Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke.', *Stroke*, 37(6), pp. 1399–406. doi: 10.1161/01.STR.0000223001.06264.af.
- Rosell, A. *et al.* (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(4), pp. 1121–1126. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.500868.
- Saijo, K. *et al.* (2009) 'A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death.', *Cell*. NIH Public Access, 137(1), pp. 47–59. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.038.
- Sakharov, D. V, Hekkenberg, R. T. and Rijken, D. C. (2000) 'Acceleration of fibrinolysis by high-frequency ultrasound: the contribution of acoustic streaming and temperature rise.', *Thrombosis research*, 100(4), pp. 333–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113277> (Accessed: 16 September 2016).
- Sammani, S. *et al.* (2010) 'Differential Effects of Sphingosine 1-Phosphate Receptors on Airway and Vascular Barrier Function in the Murine Lung', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43(4), pp. 394–402. doi: 10.1165/rcmb.2009-0223OC.
- San Roman, L. *et al.* (2012) 'Single-Center Experience of Cerebral Artery Thrombectomy Using the TREVO Device in 60 Patients With Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 43(6), pp. 1657–1659. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.640011.
- Sandoval, K. E. and Witt, K. A. (2008) 'Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke', *Neurobiology of Disease*. Elsevier Inc., 32(2), pp. 200–219. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.005.
- Sawant, D. A. *et al.* (2011) 'Role of  $\beta$ -Catenin in Regulating Microvascular Endothelial Cell Hyperpermeability', *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 70(2), pp. 481–488. doi: 10.1097/TA.0b013e31820b3ed7.
- Schaller, B. and Graf, R. (2004a) 'Cerebral Ischemia and Reperfusion: The Pathophysiologic Concept as a Basis for Clinical Therapy', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 24(12), pp. 351–371. doi: 10.1097/00004647-200404000-00001.
- Schaller, B. and Graf, R. (2004b) 'Cerebral Ischemia and Reperfusion: The Pathophysiologic Concept as a Basis for Clinical Therapy', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 24(12), pp. 351–371. doi: 10.1097/00004647-200404000-00001.
- Schaphorst, K. L. *et al.* (2003) 'Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 285(1), pp. L258-67. doi: 10.1152/ajplung.00311.2002.
- Schilling, M. *et al.* (2005) 'Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice.', *Experimental neurology*, 196(2), pp. 290–7. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.08.004.
- Schilling, M. *et al.* (2009) 'Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell

- recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice', *Neuroscience*, 161(3), pp. 806–812. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.025.
- Shichita, T. *et al.* (2009) 'Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury.', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 15(8), pp. 946–950. doi: 10.1038/nm.1999.
- Shuaib, A., Lees, K. R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H.-C., Ashwood, T., Wasiewski, W. W., Emeribe, U., *et al.* (2007) 'NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 357(6), pp. 562–571. doi: 10.1056/NEJMoa070240.
- Shuaib, A., Lees, K. R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H.-C., Ashwood, T., Wasiewski, W. W. and Emeribe, U. (2007) 'NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 357(6), pp. 562–571. doi: 10.1056/NEJMoa070240.
- Siesjo, B. K. (1992) 'Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology', *J Neurosurg*, 77(2), pp. 169–184. doi: 10.3171/jns.1992.77.2.0169.
- Skilbeck, C. *et al.* (2001) 'Population of the vessel wall by leukocytes binding to P-selectin in a model of disturbed arterial flow.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(8), pp. 1294–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498456> (Accessed: 2 September 2018).
- Smith, C. J. *et al.* (2015) 'Phase II anti-inflammatory and immune-modulating drugs for acute ischaemic stroke.', *Expert opinion on investigational drugs*, 24(5), pp. 623–43. doi: 10.1517/13543784.2015.1020110.
- Smith, C. J. *et al.* (2018) 'SCIL-STROKE (Subcutaneous Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Stroke)', *Stroke*, 49(5), pp. 1210–1216. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020750.
- Sobrinho García, P. *et al.* (2013) 'Clasificación etiológica del ictus isquémico: comparación entre la nueva clasificación A-S-C-O y la clasificación del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología', *Neurología*. Elsevier, 28(7), pp. 417–424. doi: 10.1016/j.nrl.2012.07.005.
- Solé, S. *et al.* (2004) 'Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 63(4), pp. 338–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099024> (Accessed: 23 March 2017).
- Spectre, G. *et al.* (2012) 'Platelets selectively enhance lymphocyte adhesion on subendothelial matrix under arterial flow conditions.', *Thrombosis and haemostasis*, 108(2), pp. 328–37. doi: 10.1160/TH12-02-0064.
- Spengos, K., Tsvigoulis, G. and Zakopoulos, N. (2006) 'Blood pressure management in acute stroke: a long-standing debate.', *European neurology*. Karger Publishers, 55(3), pp. 123–35. doi: 10.1159/000093212.
- Squadrito, G. L. *et al.* (2000) 'Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 376(2), pp. 333–7. doi: 10.1006/abbi.2000.1721.
- Staszewski, J. *et al.* (2009) 'Intravenous insulin therapy in the maintenance of strict glycemic control in nondiabetic acute stroke patients with mild hyperglycemia.', *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. Elsevier, 20(2), pp. 150–4. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.11.013.
- De Stefano, N., Silva, D. G. and Barnett, M. H. (2017) 'Effect of Fingolimod on Brain Volume

- Loss in Patients with Multiple Sclerosis', *CNS Drugs*. Springer International Publishing, pp. 1–17. doi: 10.1007/s40263-017-0415-2.
- Stoll, G., Kleinschnitz, C. and Nieswandt, B. (2008) 'Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment', *Blood*, 112(9), pp. 3555–62. doi: 10.1182/blood-2008.
- Stone, M. L. *et al.* (2015) 'Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonism attenuates lung ischemia-reperfusion injury', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(12), pp. L1245–L1252. doi: 10.1152/ajplung.00302.2014.
- Strong, A. J. and Dardis, R. (2005) 'Depolarisation phenomena in traumatic and ischaemic brain injury.', *Advances and technical standards in neurosurgery*, 30, pp. 3–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16350451> (Accessed: 7 February 2017).
- Suh, S. W. *et al.* (2008) 'Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke.', *Annals of neurology*, 64(6), pp. 654–63. doi: 10.1002/ana.21511.
- Sun, L. *et al.* (2010) 'Oxygen therapy reduces secondary hemorrhage after thrombolysis in thromboembolic cerebral ischemia.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Nature Publishing Group, 30(9), pp. 1651–60. doi: 10.1038/jcbfm.2010.50.
- Sun, N. *et al.* (2016) 'Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Modulation Attenuates Experimental Intracerebral Hemorrhage.', *Stroke*, 47(7), pp. 1899–906. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.012236.
- Suzuki, H. *et al.* (1999) 'Reduction of ischemic brain injury by anti-P-selectin monoclonal antibody after permanent middle cerebral artery occlusion in rat.', *Neurological research*, 21(3), pp. 269–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319335> (Accessed: 7 March 2017).
- Taylor, A., Cooper, D. and Granger, D. N. (2005) 'Platelet–Vessel Wall Interactions in the Microcirculation', *Microcirculation*, 12(3), pp. 275–285. doi: 10.1080/10739680590925691.
- Tarr, D. *et al.* (2013) 'Hyperglycemia accelerates apparent diffusion coefficient-defined lesion growth after focal cerebral ischemia in rats with and without features of metabolic syndrome.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(10), pp. 1556–63. doi: 10.1038/jcbfm.2013.107.
- Terruso, V. *et al.* (2009) 'Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction.', *Neuroepidemiology*, 33(3), pp. 261–5. doi: 10.1159/000229781.
- The Emerging Risk Factors Collaboration (2010) 'Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies.', *Lancet (London, England)*. Elsevier, 375(9733), pp. 2215–22. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
- Thrift, A. G. *et al.* (2001) 'Incidence of the major stroke subtypes: initial findings from the North East Melbourne stroke incidence study (NEMESIS).', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 32(8), pp. 1732–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486098> (Accessed: 13 September 2016).
- TISC (2000) 'Tirilazad Mesylate in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 31(9). Available at: <http://stroke.ahajournals.org/content/31/9/2257.long> (Accessed: 28 March 2017).
- Tran, F. H. and Zheng, J. J. (2017) 'Modulating the wnt signaling pathway with small molecules', *Protein Science*. doi: 10.1002/pro.3122.

- Tran, K. A. *et al.* (2016) 'Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis.', *Circulation*, 133(2), pp. 177–86. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982.
- Tsuruta, R. *et al.* (2010) 'Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats', *Brain Research*, 1309, pp. 155–163. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.065.
- Turner, R. J. and Sharp, F. R. (2016) 'Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke.', *Frontiers in cellular neuroscience*, 10(March), p. 56. doi: 10.3389/fncel.2016.00056.
- Uhl, B. *et al.* (2014) 'Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(7), pp. 1495–504. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303721.
- Underly, R. G. *et al.* (2017) 'Pericytes as Inducers of Rapid, Matrix Metalloproteinase-9-Dependent Capillary Damage during Ischemia', *The Journal of Neuroscience*, 37(1), pp. 129–140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2891-16.2017.
- Unno, Y., Katayama, M. and Shimizu, H. (2010) 'Does Functional Outcome in Acute Ischaemic Stroke Patients Correlate with the Amount of Free-Radical Scavenger Treatment?', *Clinical Drug Investigation*, 30(3), pp. 143–155. doi: 10.2165/11535500-000000000-00000.
- Urra, X. *et al.* (2009) 'Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke', *Neuroscience*, 158(3), pp. 1174–1183. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.014.
- Urra, X. *et al.* (2015) 'Mechanical Thrombectomy in and Outside the REVASCAT Trial', *Stroke*, 46(12).
- Urra, X. *et al.* (2017) 'Neuroanatomical correlates of stroke-associated infection and stroke-induced immunodepression.', *Brain, behavior, and immunity*, 60, pp. 142–150. doi: 10.1016/j.bbi.2016.10.004.
- Urra, X. and Chamorro, Á. (2013) 'Emerging issues in acute ischemic stroke', *Journal of Neurology*. Springer-Verlag, 260(6), pp. 1687–1692. doi: 10.1007/s00415-013-6919-x.
- Vangeison, G. and Rempe, D. A. (2009) 'The Janus-faced effects of hypoxia on astrocyte function.', *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. NIH Public Access, 15(6), pp. 579–88. doi: 10.1177/1073858409332405.
- Veltkamp, R. and Gill, D. (2016) 'Clinical Trials of Immunomodulation in Ischemic Stroke', *Neurotherapeutics*. Springer US, 13(4), pp. 791–800. doi: 10.1007/s13311-016-0458-y.
- Vidale, S. *et al.* (2017) 'Postischemic Inflammation in Acute Stroke', *Journal of Clinical Neurology*, 13(1), p. 1. doi: 10.3988/jcn.2017.13.1.1.
- de Vries, H. E. *et al.* (1997) 'The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases.', *Pharmacological reviews*, 49(2), pp. 143–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228664>.
- Wang, C. X. and Shuaib, A. (2007) 'Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury.', *Progress in neurobiology*, 83(3), pp. 140–148. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.07.006.
- Wang, G. *et al.* (2016) 'Oxidant Sensing by TRPM2 Inhibits Neutrophil Migration and Mitigates Inflammation', *Developmental Cell*, 38(5), pp. 453–462. doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.014.

- Wang, Q., Tang, X. N. and Yenari, M. A. (2007) 'The inflammatory response in stroke.', *Journal of neuroimmunology*. NIH Public Access, 184(1–2), pp. 53–68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014.
- Wang, X. *et al.* (2004) 'Mechanisms of Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke', *Stroke*, 35(11\_suppl\_1), pp. 2726–2730. doi: 10.1161/01.STR.0000143219.16695.af.
- Wang, X. and Lo, E. H. (2003) 'Triggers and Mediators of Hemorrhagic Transformation in Cerebral Ischemia', *Molecular Neurobiology*. Humana Press, 28(3), pp. 229–244. doi: 10.1385/MN:28:3:229.
- Wang, Z. *et al.* (2016) 'Serum Uric Acid Levels and Outcomes After Acute Ischemic Stroke', *Molecular Neurobiology*, 53(3), pp. 1753–1759. doi: 10.1007/s12035-015-9134-1.
- Watanabe, T. *et al.* (1988) 'Preventive effect of MCI-186 on 15-HPETE induced vascular endothelial cell injury in vitro.', *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 33(1), pp. 81–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3141937> (Accessed: 28 March 2017).
- Watanabe, T. *et al.* (1994) 'Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 268(3), pp. 1597–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138971> (Accessed: 28 March 2017).
- White, B. C. *et al.* (2000) 'Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury.', *Journal of the neurological sciences*. Elsevier, 179(S 1-2), pp. 1–33. doi: 10.1016/S0022-510X(00)00386-5.
- Whiteley, W. N. *et al.* (2012) 'Risk factors for intracranial hemorrhage in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a systematic review and meta-analysis of 55 studies.', *Stroke*, 43(11), pp. 2904–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.665331.
- Witt, K. A. *et al.* (2008) 'Reoxygenation stress on blood–brain barrier paracellular permeability and edema in the rat', *Microvascular Research*, 75(1), pp. 91–96. doi: 10.1016/j.mvr.2007.06.004.
- Word Health Organization (2012) *Global Health Estimates*, Word Health Organization. Available at: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/).
- Wu, T. W. *et al.* (2000) 'MCI-186: further histochemical and biochemical evidence of neuroprotection.', *Life sciences*, 67(19), pp. 2387–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065185> (Accessed: 28 March 2017).
- Yamazaki, Y., Harada, S. and Tokuyama, S. (2012) 'Post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage through the cerebral sodium-glucose transporter', *Brain Research*, 1489, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.020.
- Yang, Y. and Rosenberg, G. A. (2011) 'Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease.', *Stroke*. NIH Public Access, 42(11), pp. 3323–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.608257.
- Yemisci, M. *et al.* (2009) 'Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 15(9), pp. 1031–1037. doi: 10.1038/nm.2022.
- Yenari, M. A. *et al.* (1998) 'Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18



- integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia.', *Experimental neurology*, 153(2), pp. 223–33. doi: 10.1006/exnr.1998.6876.
- Yilmaz, G. *et al.* (2006) 'Role of T Lymphocytes and Interferon- $\gamma$  in Ischemic Stroke', *Circulation*, 113(17).
- Yilmaz, G. and Granger, D. N. (2008) 'Cell adhesion molecules and ischemic stroke.', *Neurological research*. NIH Public Access, 30(8), pp. 783–93. doi: 10.1179/174313208X341085.
- Ying, W. *et al.* (2002) 'Acidosis Potentiates Oxidative Neuronal Death by Multiple Mechanisms', *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Science Ltd., 73(4), pp. 1549–1556. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0731549.x.
- Yip, P. K. *et al.* (1991) 'Effect of plasma glucose on infarct size in focal cerebral ischemia-reperfusion.', *Neurology*, 41(6), pp. 899–905. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2046937> (Accessed: 4 April 2017).
- Yu, Z. F. *et al.* (1998) 'Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo.', *Journal of neuroscience research*, 53(5), pp. 613–25. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980901)53:5<613::AID-JNR11>3.0.CO;2-1.
- Yuan, J. (2009) 'Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke.', *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. NIH Public Access, 14(4), pp. 469–77. doi: 10.1007/s10495-008-0304-8.
- Zaidat, O. O. *et al.* (2018) 'First Pass Effect: A New Measure for Stroke Thrombectomy Devices.', *Stroke*, 49(3), pp. 660–666. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.020315.
- Zamora, C. A., Baron, D. and Heffner, J. E. (1991) 'Washed human platelets prevent ischemia-reperfusion edema in isolated rabbit lungs.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 70(3), pp. 1075–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032973> (Accessed: 16 March 2017).
- Zhang, L.-H. and Wei, E.-Q. (2003) 'Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on transient global cerebral ischemia in rats.', *Acta pharmacologica Sinica*, 24(12), pp. 1241–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653951> (Accessed: 7 March 2017).
- Zhang, R. L. *et al.* (1994) 'Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat.', *Neurology*, 44(9), pp. 1747–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7936308> (Accessed: 30 March 2017).
- Zhu, Z. *et al.* (2015a) 'Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke CLINICAL PERSPECTIVE', *Circulation*, 132(12), pp. 1104–1112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016371.
- Zhu, Z. *et al.* (2015b) 'Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke CLINICAL PERSPECTIVE', *Circulation*, 132(12), pp. 1104–1112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016371.
- Zipp, F. and Aktas, O. (2006) 'The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases', *Trends in Neurosciences*, 29(9), pp. 518–527. doi: 10.1016/j.tins.2006.07.006.
- del Zoppo, G. *et al.* (2000) 'Inflammation and Stroke : Putative Role for Cytokines , Adhesion Molecules and iNOS in Brain Response to Ischemia', *Brain Pathology*, 10, pp. 95–112.
- del Zoppo, G. J. (1999) 'Antithrombotic Treatments in Acute Ischemic Stroke', *Thrombosis and Haemostasis*. Schattauer Publishers, 82(2), pp. 938–946.



del Zoppo, G. J. (2009) 'Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia', *Neuroscience*. IBRO, 158(3), pp. 972–982. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.028.

del Zoppo, G. J. (2010a) 'The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207(ii), pp. 46–49. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05760.x.

del Zoppo, G. J. (2010b) 'The neurovascular unit in the setting of stroke', *J Intern Med*, 267(2), pp. 156–171. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.

Del Zoppo, G. J. (2010) 'Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207(1), pp. 143–148. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05761.x.

del Zoppo, G. J. and Mabuchi, T. (2003) 'Cerebral Microvessel Responses to Focal Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 23, pp. 879–894. doi: 10.1097/01.WCB.0000078322.96027.78.

*ANEXOS*



## RESEARCH ARTICLE

## STROKE

# Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia

Gemma Llovera,<sup>1,2</sup> Kerstin Hofmann,<sup>1,2</sup> Stefan Roth,<sup>1,2</sup> Angelica Salas-Pédomo,<sup>3,4</sup> Maura Ferrer-Ferrer,<sup>3,4</sup> Carlo Perego,<sup>5</sup> Elisa R. Zanier,<sup>5</sup> Uta Mamrak,<sup>1,2</sup> Andre Rex,<sup>6</sup> Hélène Party,<sup>7</sup> Véronique Agin,<sup>7</sup> Claudine Fauchon,<sup>8</sup> Cyrille Orset,<sup>7,8</sup> Benoît Haelewyn,<sup>7,8</sup> Maria-Grazia De Simoni,<sup>5</sup> Ulrich Dirnagl,<sup>6</sup> Ulrike Grittner,<sup>9</sup> Anna M. Planas,<sup>3,4</sup> Nikolaus Plesnila,<sup>1,2</sup> Denis Vivien,<sup>7,8</sup> Arthur Liesz<sup>1,2\*</sup>

Numerous treatments have been reported to provide a beneficial outcome in experimental animal stroke models; however, these treatments (with the exception of tissue plasminogen activator) have failed in clinical trials. To improve the translation of treatment efficacy from bench to bedside, we have performed a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT) to test a potential stroke therapy under circumstances closer to the design and rigor of a clinical randomized control trial. Anti-CD49d antibodies, which inhibit the migration of leukocytes into the brain, were previously investigated in experimental stroke models by individual laboratories. Despite the conflicting results from four positive and one inconclusive preclinical studies, a clinical trial was initiated. To confirm the preclinical results and to test the feasibility of conducting a pRCT, six independent European research centers investigated the efficacy of anti-CD49d antibodies in two distinct mouse models of stroke in a centrally coordinated, randomized, and blinded approach. The results pooled from all research centers revealed that treatment with CD49d-specific antibodies significantly reduced both leukocyte invasion and infarct volume after the permanent distal occlusion of the middle cerebral artery, which causes a small cortical infarction. In contrast, anti-CD49d treatment did not reduce lesion size or affect leukocyte invasion after transient proximal occlusion of the middle cerebral artery, which induces large lesions. These results suggest that the benefits of immune-targeted approaches may depend on infarct severity and localization. This study supports the feasibility of performing pRCTs.

## INTRODUCTION

Ischemic stroke, a leading cause of death and disability worldwide (1), induces the rapid loss of specific brain functions, a result of insufficient blood flow to specific brain regions. Together with other downstream effects, stroke triggers an acute inflammatory response in the brain, which activates harmful signaling cascades that contribute to secondary brain damage (2). Although stroke places enormous medical and economic burdens on society, thrombolysis with tissue plasminogen activator (tPA) is currently the only clinically approved therapy for ischemic stroke. Safety considerations require, however, that tPA must be administered within a very narrow time window after the onset of symptoms, and tPA treatment has important contraindications such as hemorrhage or oral anticoagulation (3, 4). Because of these constraints,

tPA is only provided to a small percentage of all stroke patients in industrialized countries; the overall therapeutic impact of tPA is negligible when developing countries are also considered.

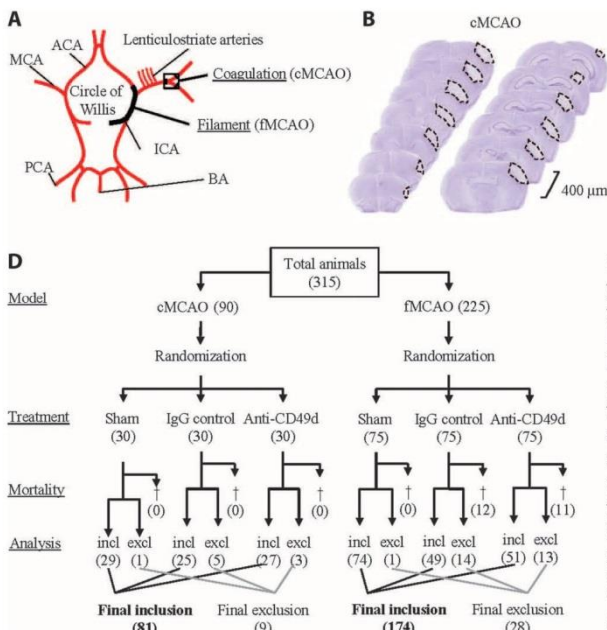
In recent decades, several experimental therapies have been developed and tested for their ability to mitigate stroke-related brain injury, which can include postischemic, excitotoxic neuronal damage, spreading depolarization, apoptosis, and/or inflammation (5, 6). Unfortunately, none of the tested drugs that show promise in animal models of stroke have so far been translated into clinical use for stroke patients (7, 8), and most major pharmaceutical companies have stopped research and development in this area. The cause of this failure in clinical trials is multifactorial and may include poorly designed preclinical and clinical studies, biased selection of substances for clinical testing, and underpowered clinical trials with overambitious and pathophysiologically irrelevant therapeutic windows (5, 9). Indeed, academic and industrial researchers, as well as funding agencies and journals, now recognize the existence of a “reproducibility crisis”: the results of preclinical studies in many research fields, including stroke, lack robustness, and only a small fraction of these studies can be replicated (10).

To overcome the current limitations of preclinical *in vivo* studies, strict operational and statistical guidelines have been developed for the data reporting, and suggestions have been implied for design and performance of preclinical studies (11). In addition, pRCTs have been proposed as a way to help bridge the gap between experimental laboratory research and clinical trials (12–14). Such studies would be primarily confirmatory, designed to test efficacy of previously defined therapeutic concepts in a study design with the highest standards for statistics, analysis, and reporting (15). Finally, such a study will have many of the

<sup>1</sup>Institute for Stroke and Dementia Research, Klinikum der Universität München, Feodor-Lyden-Strasse 17, 81377 Munich, Germany. <sup>2</sup>Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), 81377 Munich, Germany. <sup>3</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 08036 Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Àrea de Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Neuroscience Department, IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, 20156 Milan, Italy. <sup>6</sup>Department of Experimental Neurology and Center for Stroke Research Berlin (CSB), Charité–Universitätsmedizin Berlin; German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) and German Center for Cardiovascular Diseases (DZHK), Berlin sites; Excellence Cluster NeuroCure, 10117 Berlin, Germany. <sup>7</sup>INSERM, UMR-S U919, Université de Caen Basse-Normandie, team Serine Proteases and Pathophysiology of the neurovascular Unit, GIP Cyceon, F-14074 Caen Cedex, France. <sup>8</sup>Experimental Stroke Research Platform (ESRP), IBISA platform, Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB), Université de Caen Basse-Normandie, F-14074 Caen Cedex, France. <sup>9</sup>Department of Biostatistics and Clinical Epidemiology, Charité–Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany.

\*Corresponding author. E-mail: arthur.liesz@med.uni-muenchen.de





**Fig. 1. Animal models and analysis diagram.** (A) Illustration of the circle of Willis looking caudally from the rostral side, indicating the MCAs with the distal or proximal occlusion sites used in the cMCAO or fMCAO models, respectively. ACA, anterior cerebral artery; BA, basilar artery; PCA, posterior cerebral artery; ICA, internal carotid artery. (B and C) Representative cresyl violet (CV)-stained sections 7 days after cMCAO (B) or 4 days after fMCAO (C). Dashed lines demarcate the lesion area. (D) Protocol diagram summarizing the number of animals included (incl) (315 mice), with exclusion (excl) per group and included animal numbers for final analysis. Exclusion criteria were defined as described in Materials and Methods. “+” indicates dead animals.

ing the number of animals included (incl) (315 mice), with exclusion (excl) per group and included animal numbers for final analysis. Exclusion criteria were defined as described in Materials and Methods. “+” indicates dead animals.

characteristics of adequately powered clinical trials. Several international consortia have been established to perform such studies, and multicenter investigations have been reported, but no pRCT has been published to date. Therefore, our objective was to implement a preclinical multicenter trial by applying rigorous design, experimental, and analysis standards to test the efficacy of an anti-inflammatory therapeutic intervention (that is, blocking leukocyte migration with anti-CD49d antibodies) in two experimental models of stroke.

Brain leukocyte invasion is a key mechanism that mediates secondary neuronal injury after an acute brain lesion (2, 16). Transendothelial migration is tightly regulated by adhesion molecules, specifically the interaction between the molecules VLA-4 (leukocyte very late antigen-4) and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) (17, 18). Antibodies against the  $\alpha$  chain of VLA-4 (anti-CD49d antibodies) have shown efficacy in several models of autoimmune diseases, and the humanized antibody natalizumab is currently one of the most effective therapies for patients with multiple sclerosis (19). Four single-center studies reported that anti-CD49d antibodies confer cerebroprotective properties in mouse models of brain ischemia by blocking the postischemic invasion of leukocytes into the brain (20–23). However, one of these studies reported different efficacies between different stroke models (20). The neuroprotective potential of anti-CD49d treatment was challenged further by a subsequent study that reported no treatment effect (24). A phase 2 clinical trial is currently testing the effect of natalizumab in patients after acute ischemic stroke (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01955707).

The availability of reliable preclinical data is essential for selecting the drug candidates with the highest clinical potential and for designing the most effective clinical study, thereby minimizing unnecessary, costly, and even harmful clinical trials. We therefore tested anti-CD49d

3: Barcelona (A.M.P.), center 4: Munich (N.P.), and center 5: Berlin (U.D.)), whereas the sixth center centrally coordinated the study and analyzed the data (Munich, A.L.). A total of 81 and 174 mice were included in the final analyses of the cMCAO and fMCAO groups, respectively (Fig. 1D). The animals’ physical features, mortality incidences, and reasons for exclusion are summarized in Table 1. The body temperature of the mice at center 3 differed significantly from the other centers, and the body weight of the mice at center 4 differed significantly from the other centers; however, all values were within their respective normal physiological range for mice.

**Anti-CD49d treatment reduces infarct volume after cortical stroke**

Previous studies performed in individual laboratories with relatively small sample sizes suggested that anti-CD49d antibodies might improve outcome after stroke (20–23); in contrast, another study reported no significant benefit of this treatment (24). We therefore examined the efficacy of anti-CD49d treatment in experimental ischemic stroke by performing a pRCT, using pooled infarct volume of all centers per each stroke model as the primary end points. The anti-CD49d antibody or a control immunoglobulin G (IgG) antibody (300  $\mu$ g each) was administered intraperitoneally in a randomized and blinded fashion 3 hours after stroke induction. Analysis of the pooled data from all centers revealed that treatment with anti-CD49d antibodies resulted in 19% smaller infarct volume 7 days after cMCAO compared to administration of control IgG ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2A). In contrast, 4 days after inducing fMCAO, infarct volume did not differ between control IgG-treated and anti-CD49d-treated mice, regardless of whether the data were analyzed for each individual center or as a pooled data set (Fig. 2B). To additionally show the effect sizes (ESS, standardized mean difference) of

treatment in a multicenter, randomized preclinical trial. The predetermined primary end point for the trial was infarct volume measured in two ischemic stroke models. The secondary end points were functional outcome and the invasion of leukocytes into the brain.

**RESULTS**

For this experimental trial, we used two different models of focal brain ischemia (Fig. 1, A to C) to address potential pathophysiological differences among commonly used stroke models (25, 26). Small lesions confined to the cortex were induced by coagulation of the distal middle cerebral artery (cMCAO), whereas lesions in the cortex and subcortical structures were induced by transiently occluding the MCA at its origin for 60 min with an endovascular filament (fMCAO). A total of 315 male C57BL/6J mice from the following five independent European research centers were randomized in this trial by the author indicated by their initials [center 1: Caen (D.V.), center 2: Milan (M.-G.D.S.), center

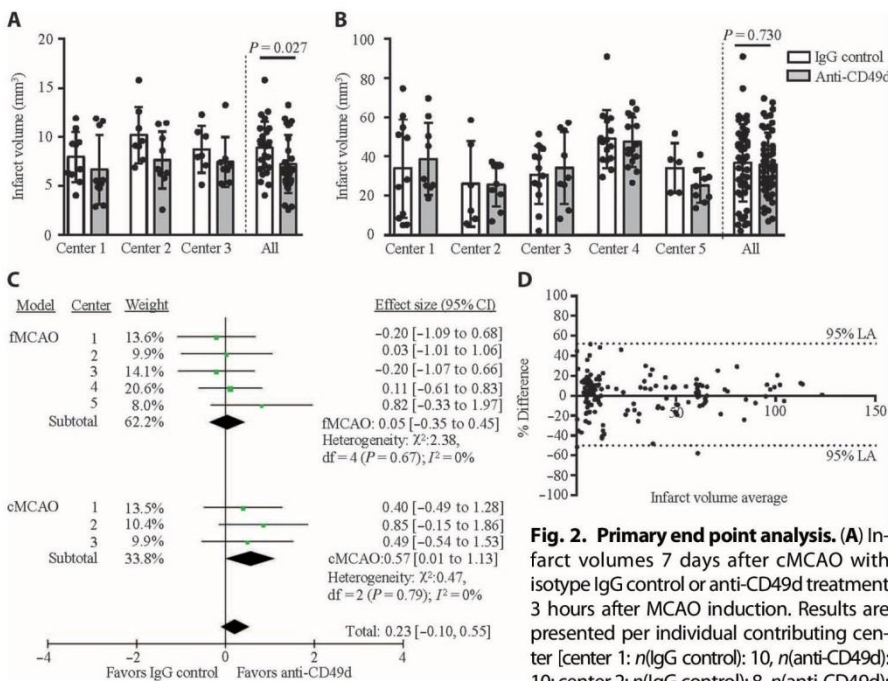
Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on September 10, 2018



**Table 1. Animal characteristics.**

Center	Stroke model	Time after lesion (days)	Total n	Mortality	Exclusion: No infarct	Exclusion: Other criteria*	Final n	Mean body temperature <sup>†</sup>	Mean body weight
1	Filament	4	45	1	9	1	34	37.43	25.02
2	Filament	4	45	9	6	—	30	37.88	23.13
3	Filament	4	45	6	3	—	36	38.77 <sup>‡</sup>	23.35
4	Filament	4	45	—	—	—	45 <sup>§</sup>	—	20.60 <sup>‡</sup>
5	Filament	4	45	7	2	7	29	37.95	24.81
1	Coagulation	7	30	—	—	—	30	37.51	24.62
2	Coagulation	7	30	—	2	2	26	37.74	23.39
3	Coagulation	7	30	—	5	—	25	38.35 <sup>‡</sup>	23.88

\*Other exclusion criteria: Neuroscore <8 at 24 hours after fMCAO, overt mechanical damage, or disruption of the brain sample or sham animals with lesion. <sup>†</sup>Baseline values before anesthesia induction. <sup>‡</sup> $P < 0.05$  [analysis of variance (ANOVA)]. <sup>§</sup> $P < 0.05$  ( $\chi^2$ ).



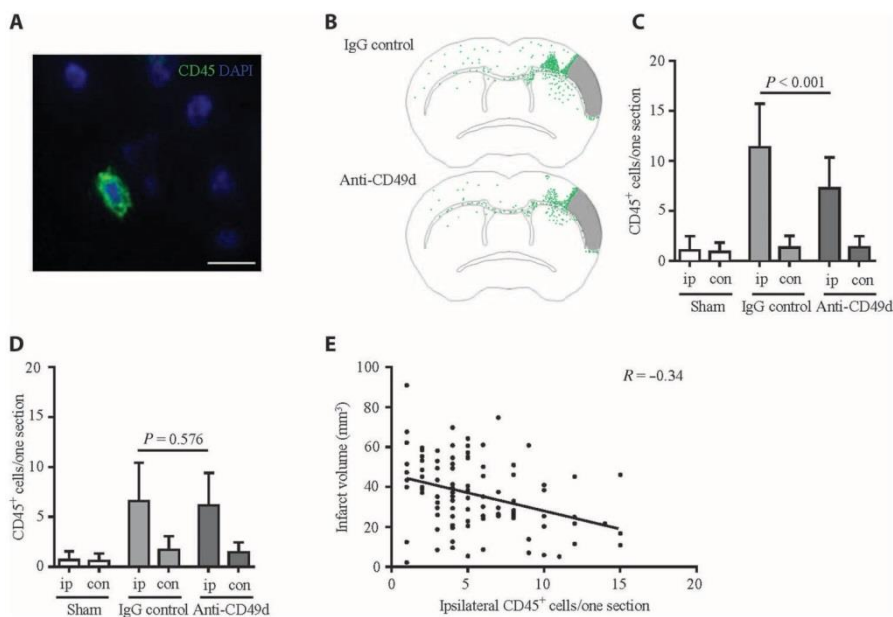
**Fig. 2. Primary end point analysis.** (A) Infarct volumes 7 days after cMCAO with isotype IgG control or anti-CD49d treatment 3 hours after MCAO induction. Results are presented per individual contributing center [center 1:  $n(\text{IgG control})$ : 10,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 10; center 2:  $n(\text{IgG control})$ : 8,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 9; and center 3:  $n(\text{IgG control})$ : 7,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 8] and as pooled samples from all centers [ $N(\text{IgG control})$ : 25,  $N(\text{anti-CD49d})$ : 27]. Mixed model analysis revealed significantly ( $\beta = 1.8$ ,  $SE = 0.8$ ,  $P = 0.027$ ) lower infarct volumes in the anti-CD49d treatment group. (B) Corresponding results for infarct volumes 4 days after fMCAO ( $\beta = -0.3$ ,  $SE = 3.3$ ,  $P = 0.947$ ). Results are presented per individual contributing center [center 1:  $n(\text{IgG control})$ : 11,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 9; center 2:  $n(\text{IgG control})$ : 6,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 9; center 3:  $n(\text{IgG control})$ : 12,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 9; center 4:  $n(\text{IgG control})$ : 15,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 15; and center 5:  $n(\text{IgG control})$ : 5,  $n(\text{anti-CD49d})$ : 9] and as pooled samples from all centers [ $N(\text{IgG control})$ : 49,  $N(\text{anti-CD49d})$ : 51]. Center labels for contributing centers are consistent between the two stroke models. Data are presented as means  $\pm$  SD. (C) Forest plot of ES estimation by the inverse-variance method in a random-effects model in individual centers and in all-center pooled data, corresponding to centers depicted in (A) and (B). (D) Bland-Altman plot for interrater concordance of infarct volume measurement for the two independent and blinded raters at the central study center. LA, limit of agreement.

antibody treatment in the two stroke models, we performed a meta-analysis using inverse-variance weighting (random-effects model) from all centers; these results are illustrated as a forest plot (Fig. 2C).

Consistent with the results from the mixed model analysis used to test the primary end point (Fig. 2, A and B), the result from the cMCAO model showed no significant effect of treatment if analyzed separately for each center, whereas a subtotal analysis (pooled for cMCAO) revealed a significant treatment effect [ES, 0.57; 95% confidence interval (CI), 0.01 to 1.13]. As in the mixed model primary analysis, no significant effect was found in the analysis for pooled infarct volume after fMCAO. When the data were pooled from all treatment centers and both models, the ES no longer favored treatment (ES, 0.23; 95% CI, -0.1 to 0.55).

Next, we investigated the accuracy of our assessment of the primary end point. Infarct volume was independently measured by two researchers (G.L. and A.L.) at the central study center. These researchers were blinded with respect to the groups, and concordance of their results was confirmed using Bland-Altman analysis and calculation of intraclass correlation coefficient (ICC), which revealed excellent interrater reliability (ICC, 0.99; 95% CI, 0.990 to 0.994; Fig. 2D and fig. S1A). Moreover, each study center reevaluated the infarct volumes of the samples, confirming reliability between the central analysis and the analyses from each center (ICC range, 0.88 to 0.99; fig. S1B). Together, these results support the hypothesis that anti-CD49d treatment reduces infarct volume in cortical lesions after permanent MCA occlusion; moreover, our results suggest that treatment efficacy might depend on infarct type and severity, because anti-CD49d treatment was not effective after transient occlusion of the proximal MCA.





**Fig. 3. Leukocyte brain infiltration after cMCAO and fMCAO.** (A) Representative image of CD45 immunohistological staining in the peri-infarct area 7 days after cMCAO. Green, CD45–Alexa Fluor 488; blue, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Scale bar, 10  $\mu$ m. (B) Cumulative topographic representation of each single CD45<sup>+</sup> leukocyte detected on one coronal section per brain, excluding the infarct core area. Topographic maps for each section were superimposed for both treatment groups [*n*(IgG control): 25, *n*(anti-CD49d): 27]. Total CD45<sup>+</sup> count in ipsilateral hemispheres was 284 cells in the IgG group and 196 cells in the anti-CD49d group. (C) Quantitative analysis of CD45<sup>+</sup> cell count per one coronal section in ipsilateral (ip) and contralateral (con) hemispheres of sham-operated animals (*n* = 30) and anti-CD49d-treated (*n* = 25) or IgG control-treated (*n* = 27) mice 7 days after cMCAO. (D) Corresponding quantification of CD45<sup>+</sup> cells 4 days after fMCAO, sham-operated animals (*n* = 74), and anti-CD49d-treated (*n* = 49) or IgG control-treated (*n* = 51) mice. Data in (C) and (D) are presented as means  $\pm$  SD. (E) Linear regression analysis of CD45<sup>+</sup> cell counts per ipsilateral hemisphere of both treatment groups (*x* axis) and infarct volume (*y* axis) 4 days after fMCAO. *r*, Pearson correlation coefficient.

### Anti-CD49d treatment reduces the invasion of leukocytes into the brain after cortical stroke

Previous studies (20, 24) suggested that anti-CD49d treatment exerts its primary therapeutic effect on brain ischemia by inhibiting leukocyte invasion of the brain. To investigate this process, we prepared brain sections from mice after MCAO or sham surgery; we then immunostained the sections with antibodies against CD45, a marker for leukocytes (Fig. 3A). The stained sections were analyzed by researchers who were blinded with respect to the surgical and treatment groups. Cumulative topographic maps of leukocyte invasion after cMCAO revealed that leukocytes infiltrated the region surrounding the infarct core, with predominant localization in the peri-infarct cortical area (Fig. 3B). Anti-CD49d treatment significantly ( $P < 0.001$ ) reduced the number of leukocytes in the infarct area after cMCAO (Fig. 3, B and C), consistent with our finding of reduced lesion volume in anti-CD49d-treated mice after cMCAO. Mice that underwent fMCAO had significantly fewer cerebral leukocytes than those that underwent MCAO/cMCAO [mean (SD), 5.4 (3.6) versus 11.4 (4.4) cells per section, respectively;  $P < 0.001$ ], and anti-CD49d treatment did not affect the invasion of leukocytes after fMCAO (Fig. 3D). Because of the high variability in lesion size and location in the fMCAO model, we were unable to generate topographic maps; however, we measured a weak yet significant inverse correla-

tion between infarct volume and cerebral leukocyte count in the fMCAO-induced group (Fig. 3E), suggesting a relationship between lesion size and cellular poststroke neuroinflammation.

### Other secondary outcome parameters were not affected by anti-CD49d treatment

In addition to the infiltration of leukocytes into the brain, we also measured the following outcomes as predefined secondary end points: mortality, physiological parameters, and behavioral deficits. Our analysis revealed that none of these outcomes was significantly affected by anti-CD49d treatment. For the cMCAO model, we used the rotarod test and the adhesive removal test, two well-established functional tests for this stroke model. An analysis of functional outcome with the per-protocol analysis revealed that sensorimotor deficits in both tests (at three time points after stroke) did not differ significantly between the sham surgery group and either the control-treated or anti-CD49d-treated cMCAO groups. Hence, we were unable to discriminate between cMCAO and sham surgery, indicating that these commonly used tests lacked sufficient sensitivity to detect the limited neurological deficits in the cMCAO model (fig. S2, A to C and E). Additionally, the mean absolute values for both tests differed greatly between individual centers (fig. S2, A and B), indicating high intercenter variability in

performing these tests, despite the use of harmonized procedures. To eliminate intercenter variability as a source for increased variability for this parameter, we performed a secondary analysis in which the poststroke deficits were normalized to their respective baseline values (fig. S2F). This analysis revealed a cMCAO-induced deficit in the adhesive removal test; however, treatment with the anti-CD49d antibody had no significant effect on this deficit. Because of the substantial behavioral deficits induced by fMCAO, the tests used for cMCAO could not be applied in this model. Therefore, we tested deficits in the fMCAO model by a composite Neuroscore, with no difference apparent between treatment groups (fig. S3A); this lack of treatment effect is consistent with the lack of treatment effect on infarct volume in this model. The composite Neuroscore test robustly detected significant deficits in the animals (compared to sham treatment) in all five research centers 4 days after stroke. A correlation analysis of this large cohort of animals (*n* = 174 fMCAO-induced mice) revealed moderate correlation between infarct volume and Neuroscore outcome ( $r = 0.76$  and  $r = 0.77$ , 2 and 4 days after stroke, respectively; fig. S3B). Although cMCAO did not cause mortality (within 7 days after stroke), fMCAO resulted in similar mortality rates in the control IgG-treated (16.0%) and the anti-CD49d-treated (14.6%) groups (fig. S4). Similarly, the physiological parameters (body temperature and body weight) were affected by fMCAO but not by cMCAO (fig. S5). Specifically, fMCAO-induced brain



damage led to pronounced hypothermia and weight loss, whereas sham surgery did not; however, these parameters were not affected by treatment with the anti-CD49d antibody.

## DISCUSSION

Here, we report the results of an international multicenter, randomized, controlled, and blinded experiment for the preclinical testing of drug efficacy. The design of this study was modeled on phase 3 clinical randomized controlled trials, which are the current standard in clinical drug development and are required to license a new drug. Our study was performed in response to the “replication crisis” (10), the exceedingly low reproducibility, and lack of robustness of preclinical results in academic research (27–29). In addition, our approach may help to resolve the translational roadblock, in which promising preclinical approaches fail to be translated to clinically effective therapies (30–32). Thus, international research consortia—which provide larger sample sizes with sufficient statistical power and a study design that reduces the confounding effects of bias—have been proposed as a way to improve the robustness and translational predictability of preclinical research (13, 14, 33–35).

To improve the quality and reliability of preclinical research, several international research consortia have been established, including the European Union (EU)–funded Multi-PART (Multicentre Preclinical Animal Research Team) consortium for stroke research and the National Institutes of Health–funded CAESAR (Consortium for preclinical assessment of cardioprotective therapies) consortium for cardiovascular research. Systematic efforts by these consortia and others have revealed that inadequate reporting of data, statistical flaws, and missing cross-validation of data from independent study centers are major flaws in preclinical translational research (5, 13, 33, 36, 37). Virtually all preclinical studies performed by individual research groups are underpowered and often fail to adequately control for bias (for example, using randomization and blinding) (38). For example, the average group size in more than 2000 different experiments involving more than 35,000 rodents (in which hundreds of different treatments were tested in ischemic stroke models) is only 8.6 animals per group (median, 8; range, 1 to 54) (39). Ioannidis *et al.* (34) examined a random sample of *in vivo* animal studies published since 2006 and found that fewer than 30% of studies used randomization and fewer than 10% performed a blinded assessment of outcome; with respect to experimental stroke research, these percentages are even lower (40). A meta-analysis of 49 published preclinical meta-analyses (comprising 730 primary individual studies in the field of neuroscience) revealed that the median statistical power was only 21% (41). This means that of 100 studies that are conducted to investigate a genuine treatment effect, only 21 will actually be powered in such a way as to be able to demonstrate the effect, a result of small sample sizes. Until as recently as several decades ago, clinical trials were challenged by the same issues that face preclinical biomedical research today, including low internal validity, low statistical power, and a high rate of false positives. By developing and implementing rigorous standards for the design, execution, analysis, and reporting of studies, today's clinical trials can deliver robust and relevant results. Learning—and adopting key measures—from current clinical trial design (for example, randomization, blinding, and *a priori* power analysis), as in our pRCT, may help to overcome the current crisis of preclinical translational medicine. Such an approach has clear advantages over a meta-analysis,

which pools results from studies with different methodological and statistical standards, potentially differing protocols, and lack of monitoring. In contrast, as explained in detail below, our pRCT approach aimed to harmonize protocols and warranted a prospective, blinded, and randomized study design, central monitoring of data quality, and centralized analysis and data deposition.

Here, we used the two most common experimental models of ischemic stroke to test a drug candidate that is already being tested in a phase 2 clinical trial after only a few, small-scale, single-center studies in mice. In all but one case (8), this approach in stroke research has led until now to costly failures and the exposure of patients to ineffective—or potentially harmful—drugs (42). Many other medical fields share this frustrating experience. The primary objective in the design of our study was to achieve maximum harmonization of the methods used by the various participating study centers. The basic protocol, as well as the primary and secondary end points, was predefined by coordination between the six laboratories. In clinical trials, patient care among various trial sites is relatively uniform and performed in accordance with national and international guidelines. In our study, achieving harmonization of the materials and standard operating procedures was a challenge in the initial phase of our study because the various laboratories generally use different strategies for testing drugs in the stroke models. We achieved the best possible harmonization of the surgical procedures and behavioral tests by using same-age and same-gender mice obtained from the same commercial breeder, centrally supplying all critical materials (for example, the filaments used to induce transient stroke), and defining the methods used for the surgical procedures, behavioral tests, and data acquisition. Several factors could not be harmonized fully, including the use of specific anesthetics and analgesics (a result of differences in local regulations regarding the conduct of animal experiments), the expertise of the surgeons, postsurgical care, body temperature maintenance, and monitoring of cerebral blood flow after vessel occlusion; all of these factors can potentially influence stroke outcome. Nevertheless, comparable differences in equipment, legal requirements, and the skills of the medical personnel also confound most clinical RCTs. Other variables included between-site differences in the use of sedation protocols, in postoperative anesthesia and analgesic drugs, and in mouse microbiota.

These remaining methodological differences might actually increase the robustness of our obtained results with respect to clinical translation. Indeed, we were able to demonstrate that drug efficacy could be demonstrated despite the above-mentioned procedural differences. Furthermore, increasing the sample size by pooling the efforts of multiple laboratories reduced statistical variability and increased sensitivity of outcome measures such as the infarct volume in the mCAO model, cerebral leukocyte counts, and the Neuroscore.

Another aspect of the study that was handled individually by each study site was the approval of the animal experiments. Because of differing regulatory processes in Spain, France, Italy, and Germany, a uniform approval for all European partner sites was not achievable despite the European directive 2010/63/EU. However, future pRCTs could get approval more easily or via a single-point process for all partner sites if pRCTs showed more robust results than a single study and were regarded as a part of the preclinical evaluation of drug development.

Natalizumab, a humanized anti-CD49d antibody, is currently one of the most effective disease-modifying drugs for multiple sclerosis (19). With more than 7 years of clinical use, the efficacy and safety profiles for natalizumab are well established. The major risk associated with this



treatment approach (the induction of progressive multifocal leukoencephalopathy) usually emerges after long-term treatment, but not after a single dose. Recently, several research groups established that lymphocyte invasion plays a role in stroke pathophysiology (20, 43–46). For example, lymphocyte-deficient mice have substantially smaller lesion volumes compared to wild-type mice (43). Therefore, targeting the adaptive immune system is a promising therapeutic strategy for stroke. However, the contribution of secondary neuroinflammation to post-stroke pathophysiology is far less explored, and the translatability of murine mechanisms to the human situation regarding stroke immunology is still under discussion (47, 48). On the basis of previous experimental studies with anti-CD49d antibodies in stroke models (20–22) and the safety data on natalizumab use in patients with multiple sclerosis, a phase 2 clinical trial was initiated recently to test the effect of natalizumab in patients with acute ischemic stroke [ACTION (Effect of Natalizumab on Infarct Volume in Acute Ischemic Stroke) trial, ClinicalTrials.gov identifier: NCT01955707]. During the ACTION trial, an animal study was published that reported no effect of natalizumab on stroke (24), raising concerns about the efficacy of this approach (24, 49). In contrast, in our multicenter study, consistent with previous results (20), we found that anti-CD49d treatment exerted a modest yet significant neuroprotective effect in the cMCAO model, but not in the fMCAO model of transient occlusion, which causes extensive damage. Notably, this protective effect was statistically significant when the cMCAO results were pooled from all centers but not when analyzed in each individual center. When we pooled results from both stroke models, no significant treatment effect was observed.

The difference in the neuroprotective efficacy of anti-CD49d treatment between the two models might be attributed to biological differences in the underlying pathophysiology and/or insufficient statistical power as a result of the unexpectedly high variability in the fMCAO model. In a head-to-head comparison of the fMCAO and cMCAO models, the authors found large differences in neuroinflammatory markers between the two models (26). Unexpectedly, moderate-sized cortical lesions, which appeared after permanent occlusion in the cMCAO model, induced higher levels of leukocyte brain invasion, microgliosis, and proinflammatory cytokine release than did the extensive hemispheric lesions of the transient ischemia model (26). Consistent with these results, we also found about twofold higher cerebral leukocyte counts after cMCAO than fMCAO. However, it should be noted that different time points (4 days after fMCAO versus 7 days after cMCAO) were used in the two models because of the high mortality rate in the fMCAO-treated mice after 4 to 5 days; moreover, the cMCAO model requires craniectomy and penetration of the dura. However, a recent study by Chu *et al.* reported twofold higher cerebral leukocyte cell counts after permanent occlusion by a filament in the fMCAO model compared to transient occlusion in the same stroke model, indicating that there may be pronounced leukocyte brain invasion in situations in which reperfusion is not established, regardless of the stroke model used (50). In our study, the cerebral leukocyte counts in the anti-CD49d-treated cMCAO group (the permanent occlusion model) were considerably higher than in the fMCAO group, and we found no treatment effect of anti-CD49d on the relatively low leukocyte numbers in the fMCAO model. Therefore, inhibition of the migration of leukocytes into the brain with anti-CD49d antibodies may be more effective in strokes that trigger a more robust inflammatory reaction. This possibility has been generally overlooked in preclinical testing of immunotherapeutics for stroke, and it has also not been considered in the design of clinical studies.

Because of its unique design (pooling results from five centers and the unprecedented large sample size in a single preclinical experiment),

our study provides a critical view of commonly used methods in experimental stroke research. The variability of outcomes differed substantially between the two models; specifically, the overall SD in the control-treated cMCAO group was 30% [mean (SD), 8.9 (2.7);  $n = 25$  mice], which is considerably lower than the surprisingly high SD in the control-treated fMCAO group [53%; mean (SD), 36.4 (19.9);  $n = 49$ ]. Furthermore, our study also revealed an unexpectedly weak sensitivity of some of the most widely used behavioral tests, particularly in the cMCAO model, which induced only subtle neurological deficits. The rotarod and adhesive tape removal tests are two of the most common tests performed in experimental stroke research (51), and they have been successfully used by each laboratory in our study. Nevertheless, the rotarod test failed to detect poststroke deficits compared to sham surgery, even after the test results were normalized to baseline values, thus excluding intercenter differences. Moreover, the adhesive removal test results showed wide variability, even after normalization, and therefore lacked statistical power to detect treatment effects; nevertheless, this test was able to detect significant deficits after cMCAO. In addition, the Neuroscore, which was used to quantify deficits after fMCAO, also had high variability and revealed only a moderate correlation between test results and lesion volume. It was also apparent that the laboratory with previous experience using the Neuroscore (center 2) obtained more consistent results with this test than did laboratories that used this test for the first time (fig. S3). This finding might reflect a more general challenge with respect to harmonizing procedures, which was a necessary step in designing our pRCT. For example, deciding a priori to use mice of a specific age or deciding to centrally distribute the surgical material might necessitate changes in local standard operating procedures, which, in turn, could increase variability. Nevertheless, we reasoned that harmonizing the basic procedures and using similar materials were essential for achieving a multicenter, randomized, blinded pRCT, thereby minimizing intercenter effects and facilitating the analysis of pooled data based on group means.

On the basis of the previous considerations and new methodological insights gained in our study, we were able to define several points of potential improvement for future pRCTs: an obvious limitation for our analysis strategy was the constraint to a per-protocol analysis, lacking an additional intention-to-treat analysis. This is due to a substantial amount of missing data for the primary outcome measure (infarct volume) because of mortality or no infarct demarcation. This might be circumvented in future studies by using inclusion criteria similar to clinical trials such as imaging modalities for confirmation of an infarct, a defined neurological deficit range as an inclusion criterion, and use of a behavioral readout marker or mortality as primary end point. In analogy to clinical trials, which pool stroke patients with differing stroke etiology, future pRCTs might also consider pooling outcome of different models for testing drug efficacy.

One surprise in our study was the low performance of the behavioral tests, as well as exceedingly high variability of the fMCAO model. It would be desirable to evaluate such methodological characteristics in “pretrials” before future pRCTs, with the aim to validate the used methods and grade of harmonization in-between study centers before performing the actual pRCT. Such a pretrial would also give the opportunity to include a dose-escalation study for the investigated drug before defining the dose for the pRCT. Finally, central assessment of behavioral outcomes based on video recordings might reduce variability and improve test sensitivity, which should be evaluated in a pretrial for a future pRCT.



Given the lack of funding for international collaborative confirmatory research, the apparent lack of incentives for individual researchers and laboratories, and the competitiveness associated with preclinical biomedicine, so-called pRCT studies—although deemed necessary—are often believed to be impossible to implement. Here, we report the feasibility of this approach, despite the existence of several obstacles, and we hope that this study will encourage researchers in all biomedical research fields to consider forming similar consortia to perform essential preclinical trials before advancing to clinical development; this approach is particularly relevant to biomedical research fields that have traditionally been hampered by lack of reproducibility and translational roadblock. We estimated the total full cost of our study at about €165,000 (\$ 180,000), including more than €30,000 direct drug costs (table S1). Because the use of pRCTs may avoid unnecessary clinical trials and improve our ability to predict successful translation, these costs for a confirmatory study seem reasonable (52).

Our study demonstrates that poststroke treatment with anti-CD49d antibodies confers a neuroprotective benefit in a specific mouse model of stroke. We found differences between the results from two ischemic stroke models with respect to cerebral leukocyte invasion and the efficacy of anti-CD49d treatment; therefore, future clinical trials testing immunotherapeutic drugs for stroke will need to ensure that the included study population feature a substantial neuroinflammatory reaction to the brain injury, which may improve its potential to profit from such therapeutic approaches. Finally, the ability of a pRCT to advance translational research and increase the reliability of preclinical findings should be tested by comparing the results of clinical trials with the results of their preceding pRCTs.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

A key objective of this study was to implement and to test the feasibility of performing an international pRCT in experimental biomedicine. Another objective was to use this pRCT approach to robustly test the neuroprotective effect of CD49d-specific antibodies in two murine models of experimental stroke. This study was performed from June 2013 (initiation) through October 2014 (unblinding) by an international consortium consisting of six independent research groups. The infarct volume of the pooled samples from all centers and from each model was a predetermined primary end point of the study. The secondary end points were functional outcome and the migration of leukocytes into the brain. The Munich study center (A.L.) initiated the trial, coordinated the study design, and performed central data analysis, whereas the other five centers [Caen (D.V.), Milan (M.-G.D.S.), Barcelona (A.M.P.), Munich (N.P.), and Berlin (U.D. and A.R.)] contributed to study design, performed the experimental part of the study, and validated centrally determined infarct volumes. In total, 315 male C57BL/6J mice (8 to 10 weeks of age) were used [90 mice for cMCAOMCAO model (30 mice per treated group) and 225 mice for fMCAOMCAO (75 mice per treated group)]. Overall sample size per stroke model was determined a priori by performing a power calculation with G\*Power (version 3.1) software using the two-tailed Wilcoxon-Mann-Whitney test for two groups. For both models, an  $\alpha$  level of 0.05 and a power of 0.9 were required. For the cMCAOMCAO model, a Cohen's  $d$  ES of 0.9 was used [a conservative assumption based on our previous results demonstrating an ES  $d$  of 1.2 (20)]. In contrast, previous studies using the fMCAO model in mice did

not detect a significant treatment effect that we could use to calculate ES. Therefore, we assumed an ES  $d$  of 0.6 to be biologically relevant, a highly conservative assumption based on our previous experience, which revealed greater variability of infarct volume after fMCAO compared to cMCAO. In addition, a 4-day mortality rate of 20% was assumed for the fMCAO group. This yielded a final sample size of 29 mice per treatment group for cMCAO and 63 mice per treatment group for fMCAO. Coded samples of anti-CD49d and control antibodies, as well as some additional items (for example, the filaments used to occlude the MCA and the behavioral test equipment), were distributed to each study center. The operational exclusion criteria were predefined (see below), and analytical exclusion criteria (see specifications below) were defined during data acquisition. The mice were allocated to the treatment and surgery groups using randomization lists generated with an online randomizer tool ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)) provided by the coordinating center. Treatment, surgery, analysis of infarct volume, and secondary outcome measures were performed by researchers who were blinded with respect to the treatment groups. Unblinding was performed after the statistical analyses were completed. Digital scans of the brain sections and all analysis files were stored on a central database that was accessible to all study contributors. The complete set of data is reported, including outliers. The full data set obtained from this study is publicly available at the figshare repository (<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1289824>). The study protocol is available in the Supplementary Materials as fig. S6.

### Animals

This study was conducted in accordance with the respective national guidelines regarding the use of experimental animals, and all procedures were approved by the respective government and institutional committees for the individual research groups [Munich: Regierungspräsidium Oberbayern; Barcelona: Ethics Committee (CEEA) of the University of Barcelona and the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya; Milan: Institutional guidelines and authorization by the Italian Ministry of Health; Berlin: Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin; and Caen: Regional ethics committee of Lower Normandy]. Approval for the performed experiments was reached at each study site by different means, such as including the experiments in a 3-year laboratory program, as an addendum to an existing license, or applying for a new license as a "proof-of-principle" study. In total, 315 male C57BL/6J mice (8 to 10 weeks of age) were supplied to the research groups from Charles River Laboratories (stock #664). The animals were housed in a controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12/12-hour light/dark cycle and access to pelleted food and water ad libitum. The number of mice per cage, the use of environmental enrichment, and food type were all determined individually by each research group in accordance with locally approved standard procedures. Where applicable, body weight (measured daily) and body temperature (measured on the surgery day and 1, 3, and 7 days after surgery) were measured for each mouse. All procedures regarding the study design, animal experiments, statistical analysis, and data reporting fulfill the criteria of the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines (see checklist in the Supplementary Materials as fig. S7).

### Antibody treatment

Animals received an intraperitoneal injection of antibodies 3 hours after stroke was induced (by coagulation occlusion or filament insertion); 300  $\mu\text{g}$  of monoclonal mouse anti-CD49d antibody (clone R1-2, eBioscience) or rat IgG2b isotype control antibody (clone LTF-2, Bio



X Cell) was diluted to 1 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) and prewarmed to 37°C before injection. The antibody concentration was chosen on the basis of information in two previous reports that used the same antibody clone in experimental stroke models (20, 24).

### Transient MCAO (fMCAO) model

Animals were anesthetized with isoflurane in a 30 to 70% mixture of O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O, and the temporal bone was exposed with an incision between the ear and the eye. A laser Doppler probe (at centers 1, 3, and 4) was affixed to the skull above the MCA territory. The animal was then placed in the supine position. Using a midline neck incision, the common carotid artery and the external carotid artery (right side, groups 1 to 3; left side, groups 4 and 5) were isolated and ligated; a 2-mm silicon-coated filament (#701912PK5Re, Docol) was threaded into the internal carotid artery, and MCA occlusion was confirmed by a reduction in the corresponding laser Doppler flow. After 60 min of occlusion, the animals were reanesthetized, and the filament was removed. For the postsurgical survival period, the animals were housed in their home cages with access to water and food. Sham-operated control mice received the same surgical procedure, except the filament was not inserted. Body temperature was maintained during surgery using a feedback-controlled heating pad. Analgesia was provided during surgery and in the postoperative phase in accordance with each center's local regulations.

Surgical exclusion criteria: Centers 1, 3, and 4 used laser Doppler flow during the operation to confirm sufficient MCA occlusion (a reduction in blood flow to <20% of the baseline value). In addition, at all five contributing centers, mice that did not develop sufficient neurological deficits (that is, Neuroscore <8) 24 or 48 hours after MCAO were excluded. Mice that died during the observation period were excluded from all analyses, but differences in the mortality rate between the treatment groups during the observation period were determined.

### Permanent MCAO (cMCAO) model

Centers 1, 2, and 3 performed the cMCAO procedure as described (53). In brief, the animals were anesthetized with isoflurane in a 30 to 70% mixture of O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O and placed in a lateral position. The skin was incised between the eye and the ear, the temporal muscle was removed, and the MCA was identified. A burr hole was drilled over the MCA, and the dura mater was removed carefully. The MCA was permanently occluded with either bipolar electrocoagulation forceps or an electrocauterizer. Permanent occlusion of the MCA was confirmed visually before closing the wound with sutures. During surgery, body temperature was maintained using a feedback-controlled heating pad. Sham-operated mice received the same surgical procedure without MCA coagulation.

Surgical exclusion criteria: Mice that developed a subarachnoid hemorrhage during surgery were excluded from the analysis. In addition, mice that died during the observation period were excluded from analysis.

### Functional outcome tests

The rotarod and adhesive removal tests were performed 1, 3, and 7 days after cMCAO. These tests were chosen because they are the most commonly used tests for measuring the effect of cMCAO, which results in only minor behavioral deficits, and because these tests were used previously by all three centers that performed the cMCAO model.

The rotarod test was used to measure coordination and sensorimotor performance before and after cMCAO (54). Mice were trained daily for 3 days before MCAO or sham surgery, and baseline performance was recorded the day before cMCAO using the following strategy: the rod

accelerated from 8 to 40 rpm over 240 s, with a mean of three consecutive trials per mouse and time points. The latency to fall off the rod was recorded, and postsurgical performance was calculated by dividing the postsurgical values by the individual animal's baseline performance.

The adhesive removal test was used to evaluate sensory and motor deficits (55). A round (4-mm-diameter) adhesive sticker was placed on the palmar side of the forepaw; the same pressure was applied for each adhesive application. The day before surgery (and at the indicated times after cMCAO or sham surgery), three trials per test were performed. The latency to contact the paw with the adhesive and the latency to remove the adhesive were recorded. Motor performance was expressed as the difference between the latency to contact the paw and the latency to remove the adhesive.

The Neuroscore was performed before surgery and 2 and 4 days after fMCAO or sham surgery; this test was used to evaluate the general status and focal neurologic dysfunction after fMCAO, which induces substantial deficits in contrast to the cMCAO model, and was performed as described (56). The score ranges from 0 (no deficits) to 56 (representing the poorest performance in all items) and is calculated as the sum of the general and focal deficits. The Neuroscore results were expressed as a composite neurological score, which included the following general deficits (scores): fur (0 to 2), ears (0 to 2), eyes (0 to 4), posture (0 to 4), spontaneous activity (0 to 4), and epileptic behavior (0 to 12); and the following focal deficits: body asymmetry (0 to 4), gait (0 to 4), climbing on a surface inclined at 45° (0 to 4), circling behavior (0 to 4), front-limb symmetry (0 to 4), circling behavior (0 to 4), and whisker response to light touch (0 to 4).

### Tissue sampling and processing

Mice were deeply anesthetized 7 days after cMCAO, 4 days after fMCAO, and at the respective times for mice in the corresponding sham surgery groups. The brain was removed, frozen immediately on powdered dry ice, and stored at -20°C. All biological samples were shipped on dry ice to the central analysis center in Munich, where the samples were stored at -80°C until further analysis and for central archiving. All brains were cryosectioned by researchers who were blinded with respect to the surgery and treatment groups. Coronal brain sections (20 μm thick) were prepared at 400-μm intervals and used to analyze infarct volume. In addition, 12-μm-thick coronal sections were obtained at the level of the anterior commissure and were used for immunohistochemistry. Sections were mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Scientific) and stored at -80°C.

### Infarct volumetry

Infarct volume was measured in CV-stained sections as described (53). In brief, one series of serial (20-μm-thick) sections from each animal was air-dried at room temperature for 30 min. The slides were stained with a 0.1% CV solution at 60°C for 10 min and then rinsed twice in distilled water for 1 min. After washing and dehydration, the slides were covered with Roti-Histokit mounting medium (Roth). CV-stained sections were scanned at 600 dpi on a flatbed scanner (LiDE 210, Canon). For the cMCAO model, the direct infarct demarcation on CV-stained sections (unstained area) was measured after confirming the absence of edema at the investigated time point (7 days after cMCAO or sham surgery). For the fMCAO model, we corrected the infarct volume for edema with the following equation: (Ischemic area) = (Direct lesion volume) - [(Ipsilateral hemisphere) - (Contralateral hemisphere)]. In both models, total infarct volume was determined by integrating the measured areas and distances over the sections. To validate the sections in the MCAO mice with missing lesion demarcation on CV staining,



neuronal loss was measured with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) method (TUNEL Apoptosis Detection Kit, Millipore). All sections were analyzed independently by two central investigators (G.L. and A.L.), both of whom were blinded with respect to the treatment groups; the mean of these two measurements was used for subsequent analyses. In addition, the original CV-stained slides were returned to the respective originating center for further validation. Interrater reliability between the two central investigators and the individual participating centers was measured and is shown in fig. S1.

**Analytical exclusion criteria:** The following criteria were used to exclude samples from the analysis: (i) missing biological samples due to the death of an animal before the study's end point (day 4 for fMCAO and day 7 for cMCAO;  $n = 23$  mice excluded); (ii) overt mechanical damage or disruption when preparing the brain sections, rendering the sample unusable ( $n = 2$  mice excluded); (iii) no ischemic brain lesion detectable in the MCAO group (detected as demarcation on CV staining or no neuronal apoptosis measured using TUNEL staining) ( $n = 27$  mice excluded); (iv) demarcation of an ischemic lesion on CV-stained sections in sham-operated mice ( $n = 2$  mice excluded); and (v) Neuroscore  $< 8$  points 24 hours after fMCAO ( $n = 6$  mice excluded). The individual animals that were excluded on the basis of the aforementioned criteria were also excluded from the analysis of behavioral data sets and physiological parameters.

### Immunofluorescence

We performed immunofluorescence staining for CD45 to identify leukocytes that had infiltrated the brain. Coronal sections (12  $\mu\text{m}$  thick) were prepared at the level of the anterior commissure and dried at room temperature for 1 hour. After rinsing in PBS (pH 7.4), the slides were fixed with acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ , rinsed in PBS, and incubated in blocking buffer (BB) containing 0.1% Triton, 0.05% Tween 20, 10% fetal calf serum, and 1% bovine serum albumin (w/v) in PBS at room temperature for 1 hour. The slides were then incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in anti-CD45 antibody (1:100, clone 104-2, Abcam) in BB. The slides were then rinsed in PBS and incubated for 1 hour at room temperature in Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:100, Invitrogen). Finally, the slides were rinsed in PBS, counterstained for 2 min with DAPI (1:4000, Invitrogen), and mounted using Fluoromount medium (Sigma). The slides were analyzed using an epifluorescence microscope (Axiovert 200M, Zeiss). CD45-positive cells were counted in one 12- $\mu\text{m}$  section per brain at the position of the anterior commissure (about 0.1 mm rostral to bregma). The infarct core was identified with corresponding CV-stained sections, and this area was excluded from the localization analysis and quantification of CD45-positive cells. For the cMCAO model, the location of each CD45-positive cell was marked on a topographic map according to the mouse brain atlas, yielding a cumulative localization map of leukocyte invasion for each treatment group.

### Statistical analysis

This study was designed as a prospective, multicenter, randomized controlled trial of experimental ischemic stroke induced in mice via two distinct models. The above-mentioned operational and analytical exclusion criteria were applied. If a mouse met one or more of the exclusion criteria, data and samples were excluded from all analyses. Sufficient normal distribution of all data sets was verified by checking histograms (unimodal distribution) and skewness ( $|\text{skewness}| < 1$ ). Physiological parameters and cerebral leukocyte counts were analyzed by ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test (GraphPad

Prism 6.0). The characteristics of the samples obtained from the individual centers (Table 1) were tested with Fisher's exact test, the  $\chi^2$  test, or ANOVA (where indicated), and mortality was analyzed by comparing the survival curves with the log-rank (that is, Mantel-Cox) test (GraphPad Prism 6.0). Infarct volume and behavioral deficits were tested using a linear mixed-effects model to account for heterogeneity between centers (SPSS version 22, IBM). We used random intercept models with treatment group as the independent variable and infarct volume as the dependent variable. ES estimates (standardized mean difference) were calculated using inverse-variance weighting in a random-effects model using RevMan version 5.3; RevMan 5.3 was also used to create the forest plot in Fig. 2C. Correlation analysis for infarct volume and behavioral deficits was performed using linear regression (GraphPad Prism). Concordance analysis for interrater reliability was done using the Bland-Altman method (GraphPad Prism) and calculation of ICCs (SPSS). A two-sided significance level of  $\alpha = 0.05$  for both primary hypotheses was applied.  $P$  values for secondary hypotheses should be interpreted cautiously as exploratory analyses. No adjustment for duality of the two stroke models was applied. An overview of means and 95% CI is available for all primary and secondary end points in table S2.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

[www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/7/299/299ra121/DC1](http://www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/7/299/299ra121/DC1)

Fig. S1. Analyses for interrater concordance.

Fig. S2. Behavioral tests before and after cMCAO.

Fig. S3. Composite Neuroscore for functional deficits after fMCAO.

Fig. S4. Mortality after cMCAO and fMCAO.

Fig. S5. Physiological parameter analysis after cMCAO and fMCAO.

Fig. S6. Study protocol.

Fig. S7. The ARRIVE guidelines checklist.

Table S1. Study costs (in euro).

Table S2. fMCAO and cMCAO means and CIs.

### REFERENCES AND NOTES

- G. A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod, S. M. Davis, *Stroke*. *Lancet* **371**, 1612–1623 (2008).
- Á. Chamorro, A. Meisel, A. M. Planas, X. Urra, D. van de Beek, R. Veltkamp, The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 401–410 (2012).
- W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Davalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, D. Toni; ECASS Investigators, Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1317–1329 (2008).
- E. C. Jauch, J. L. Saver, H. P. Adams Jr., A. Bruno, J. J. Connors, B. M. Demaerschalk, P. Khatri, P. W. McMullan Jr., A. I. Qureshi, K. Rosenfield, P. A. Scott, D. R. Summers, D. Z. Wang, M. Wintermark, H. Yonas; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Clinical Cardiology, Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **44**, 870–947 (2013).
- V. E. O'Collins, M. R. Macleod, G. A. Donnan, L. L. Horky, B. H. van der Worp, D. W. Howells, 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* **59**, 467–477 (2006).
- C. Iadecola, J. Anrather, Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions. *Nat. Neurosci.* **14**, 1363–1368 (2011).
- M. A. Moskowitz, Brain protection: Maybe yes, maybe no. *Stroke* **41**, S85–S86 (2010).
- J. A. Zivin, M. Fisher, U. DeGirolami, C. C. Hemenway, J. A. Stashak, Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism. *Science* **230**, 1289–1292 (1985).
- K. A. Hossmann, The two pathophysiologicals of focal brain ischemia: Implications for translational stroke research. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1310–1316 (2012).
- M. McNutt, Journals unite for reproducibility. *Science* **346**, 679 (2014).
- C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, D. G. Altman, Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **8**, e1000412 (2010).
- D. J. Lefler, R. Boli, Development of an NIH consortium for preclinical Assessment of CARDioprotective therapies (CAESAR): A paradigm shift in studies of infarct size limitation. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **16**, 332–339 (2011).



13. U. Dirnagl, A. Hakim, M. Macleod, M. Fisher, D. Howells, S. M. Alan, G. Steinberg, A. Planas, J. Boltze, S. Savitz, C. Iadecola, S. Meairs, A concerted appeal for international cooperation in preclinical stroke research. *Stroke* **44**, 1754–1760 (2013).
14. P. M. Bath, M. R. Macleod, A. R. Green, Emulating multicentre clinical stroke trials: A new paradigm for studying novel interventions in experimental models of stroke. *Int. J. Stroke* **4**, 471–479 (2009).
15. J. Kimmelman, J. S. Mogil, U. Dirnagl, Distinguishing between exploratory and confirmatory preclinical research will improve translation. *PLoS Biol.* **12**, e1001863 (2014).
16. Q. Wang, X. N. Tang, M. A. Yenari, The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* **184**, 53–68 (2006).
17. B. Engelhardt, L. Sorokin, The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* **31**, 497–511 (2009).
18. B. Engelhardt, R. M. Ransohoff, The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: Anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* **26**, 485–495 (2005).
19. R. Rudick, C. Polman, D. Clifford, D. Miller, L. Steinman, Natalizumab: Bench to bedside and beyond. *JAMA Neurol.* **70**, 172–182 (2013).
20. A. Liesz, W. Zhou, É. Mracsó, S. Karcher, H. Bauer, S. Schwarting, L. Sun, D. Bruder, S. Stegemann, A. Cerwenka, C. Sommer, M. A. Dalpke, R. Veltkamp, Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* **134**, 704–720 (2011).
21. K. Becker, D. Kindrick, J. Relton, J. Harlan, R. Winn, Antibody to the  $\alpha 4$  integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **32**, 206–211 (2001).
22. J. K. Relton, K. E. Sloan, E. M. Frew, E. T. Whalley, S. P. Adams, R. R. Lobb, Inhibition of  $\alpha 4$  integrin protects against transient focal cerebral ischemia in normotensive and hypertensive rats. *Stroke* **32**, 199–205 (2001).
23. J. Neumann, M. Riek-Burchardt, J. Herz, T. R. Doepfner, R. König, H. Hütten, E. Etemire, L. Männ, A. Klingberg, T. Fischer, M. W. Görtler, H. J. Heinze, P. Reichardt, B. Schraven, D. M. Hermann, K. G. Reymann, M. Gunzer, Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol.* **129**, 259–277 (2015).
24. F. Langhauser, P. Kraft, E. Göb, J. Leinweber, M. K. Schuhmann, K. Lorenz, M. Gelderblom, S. Bittner, S. G. Meuth, H. Wiendl, T. Magnus, C. Kleinschnitz, Blocking of  $\alpha 4$  integrin does not protect from acute ischemic stroke in mice. *Stroke* **45**, 1799–1806 (2014).
25. S. T. Carmichael, Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* **2**, 396–409 (2005).
26. W. Zhou, A. Liesz, H. Bauer, C. Sommer, B. Lahrmann, N. Valous, N. Grabe, R. Veltkamp, Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. *Brain Pathol.* **23**, 34–44 (2013).
27. F. Prinz, T. Schlange, K. Asadullah, Believe it or not: How much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 712 (2011).
28. C. G. Begley, L. M. Ellis, Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* **483**, 531–533 (2012).
29. S. Perrin, Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* **507**, 423–425 (2014).
30. G. N. Duda, D. W. Grainger, M. L. Frisk, L. Bruckner-Tuderman, A. Carr, U. Dirnagl, K. M. Einhäupl, S. Gottschalk, E. Gruskin, C. Huber, C. H. June, D. J. Mooney, E. T. Rietschel, G. Schütte, W. Seeger, M. M. Stevens, R. Urban, A. Veldman, G. Wess, H. D. Volk, Changing the mindset in life sciences toward translation: A consensus. *Sci. Transl. Med.* **6**, 264cm12 (2014).
31. M. Endres, B. Engelhardt, J. Koistinaho, O. Lindvall, S. Meairs, J. P. Mohr, A. Planas, N. Rothwell, M. Schwanninger, M. E. Schwab, D. Vivien, T. Wieloch, U. Dirnagl, Improving outcome after stroke: Overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc. Dis.* **25**, 268–278 (2008).
32. S. R. Bornstein, J. Licinio, Improving the efficacy of translational medicine by optimally integrating health care, academia and industry. *Nat. Med.* **17**, 1567–1569 (2011).
33. U. Dirnagl, M. Fisher, International, multicenter randomized preclinical trials in translational stroke research: It's time to act. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 933–935 (2012).
34. J. P. Ioannidis, S. Greenland, M. A. Hlatky, M. J. Khoury, M. R. Macleod, D. Moher, K. F. Schulz, R. Tibshirani, Increasing value and reducing waste in research design, conduct, and analysis. *Lancet* **383**, 166–175 (2014).
35. J. P. Ioannidis, Why most published research findings are false. *PLoS Med.* **2**, e124 (2005).
36. N. A. Crossley, E. Sena, J. Goehler, J. Horn, B. van der Worp, P. M. Bath, M. Macleod, U. Dirnagl, Empirical evidence of bias in the design of experimental stroke studies: A metaepidemiologic approach. *Stroke* **39**, 929–934 (2008).
37. D. W. Howells, E. S. Sena, M. R. Macleod, Bringing rigour to translational medicine. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 37–43 (2014).
38. U. Dirnagl, Bench to bedside: The quest for quality in experimental stroke research. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1465–1478 (2006).
39. CAMARADES (2014).
40. K. K. Tsilidis, O. A. Panagiotou, E. S. Sena, E. Aretouli, E. Evangelou, D. W. Howells, R. Al-Shahi Salman, M. R. Macleod, J. P. Ioannidis, Evaluation of excess significance bias in animal studies of neurological diseases. *PLoS Biol.* **11**, e1001609 (2013).
41. K. S. Button, J. P. Ioannidis, C. Mokrysz, B. A. Nosek, J. Flint, E. S. Robinson, M. R. Munafò, Power failure: Why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 365–376 (2013).
42. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: Results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology* **57**, 1428–1434 (2001).
43. C. Kleinschnitz, N. Schwab, P. Kraft, I. Hagedorn, A. Dreykluft, T. Schwarz, M. Austinat, B. Nieswandt, H. Wiendl, G. Stoll, Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* **115**, 3835–3842 (2010).
44. T. Shichita, Y. Sugiyama, H. Ooboshi, H. Sugimori, R. Nakagawa, I. Takada, T. Iwaki, Y. Okada, M. Iida, D. J. Cua, Y. Iwakura, A. Yoshimura, Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma \delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* **15**, 946–950 (2009).
45. A. E. Baird, The forgotten lymphocyte: Immunity and stroke. *Circulation* **113**, 2035–2036 (2006).
46. G. Yilmaz, T. V. Arumugam, K. Y. Stokes, D. N. Granger, Role of T lymphocytes and interferon- $\gamma$  in ischemic stroke. *Circulation* **113**, 2105–2112 (2006).
47. J. Seok, H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. López, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins, Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3507–3512 (2013).
48. J. Mestas, C. C. Hughes, Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
49. W. R. Schabitz, U. Dirnagl, Are we ready to translate T-cell transmigration in stroke? *Stroke* **45**, 1610–1611 (2014).
50. H. X. Chu, H. A. Kim, S. Lee, J. P. Moore, C. T. Chan, A. Vinh, M. Gelderblom, T. V. Arumugam, B. R. Broughton, G. R. Drummond, C. G. Sobey, Immune cell infiltration in malignant middle cerebral artery infarction: Comparison with transient cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 450–459 (2014).
51. M. Balkaya, J. M. Kröber, A. Rex, M. Endres, Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 330–338 (2013).
52. D. W. Howells, E. S. Sena, V. O'Collins, M. R. Macleod, Improving the efficiency of the development of drugs for stroke. *Int. J. Stroke* **7**, 371–377 (2012).
53. G. Llovera, S. Roth, N. Plesnila, R. Veltkamp, A. Liesz, Modeling stroke in mice: Permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. *J. Vis. Exp.* e51729 (2014).
54. B. J. Jones, D. J. Roberts, The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J. Pharm. Pharmacol.* **20**, 302–304 (1968).
55. V. Bouet, M. Bouliouard, J. Toutain, D. Divoux, M. Bernaudin, P. Schumann-Bard, T. Freret, The adhesive removal test: A sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* **4**, 1560–1564 (2009).
56. F. Orsini, P. Villa, S. Parrella, R. Zangari, E. R. Zanier, R. Gesuete, M. Stravalaci, S. Fumagalli, R. Ottria, J. J. Reina, A. Paladini, E. Micotti, R. Ribeiro-Viana, J. Rojo, V. I. Pavlov, G. L. Stahl, A. Bernardi, M. Gobbi, M. G. De Simoni, Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation* **126**, 1484–1494 (2012).

**Acknowledgments:** We thank F. Marchesi and D. Olivari for their skilled technical assistance. **Funding:** This work was supported by the excellence cluster of the German research foundation “Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy)” to A.L. and N.P. and the Daimler and Benz Foundation (32-05/12) to A.L.; grants from the Spanish Ministry of Economy (MINECO; SAF2011-30492 and SAF2014-56279) to A.M.P.; grants from the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research), the University of Caen Basse-Normandie, and the GIS IBISA to D.V.; the Italian Ministry of Health Young Investigators Award #GR-2008-1136044 to E.R.Z.; and grants from Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) (01EO0801, Center for Stroke Research Berlin) and the Hermann and Lilly Schilling Foundation to U.D. **Author contributions:** A.L. initiated this trial; A.L., U.D., A.M.P., N.P., M.-G.D.S., and D.V. designed the study protocol, supervised the study, and reviewed original data sets; G.L. performed the central analysis of all biological samples and data sets; V.A., C.F., M.F.-F., B.H., K.H., G.L., U.M., C.O., H.P., C.P., A.R., S.R., A.S.-P., and E.R.Z. performed experiments; U.G. performed central statistical analysis; and U.D., A.L., G.L., A.M.P., N.P., M.-G.D.S., and D.V. wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** The full data set obtained from this study is publicly available at the figshare repository (<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1289824>).

Submitted 24 February 2015

Accepted 23 June 2015

Published 5 August 2015

10.1126/scitranslmed.aaa9853

**Citation:** G. Llovera, K. Hofmann, S. Roth, A. Salas-Pédomo, M. Ferrer-Ferrer, C. Perego, E. R. Zanier, U. Mamrak, A. Rex, H. Party, V. Agin, C. Fauchon, C. Orset, B. Haelewyn, M.-G. De Simoni, U. Dirnagl, U. Grittner, A. M. Planas, N. Plesnila, D. Vivien, A. Liesz, Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia. *Sci. Transl. Med.* **7**, 299ra121 (2015).

