

1

Investigación básica en patología cerebrovascular. ¿Por dónde vamos?

M. Blanco, M. Rodríguez-Yáñez, R. Leira, J. Castillo



En las últimas décadas se han hecho grandes avances tanto en la prevención como el diagnóstico y el tratamiento del ictus^{1,2}. Al mismo tiempo, y gracias a los modelos animales, el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la isquemia cerebral ha avanzado muy notablemente^{3,4}. Además estos modelos han permitido localizar numerosas dianas terapéuticas^{5,6}; sin embargo, el fracaso de los tratamientos neuroprotectores en clínica humana ha conducido a un gran debate sobre la utilidad de los modelos animales en esta compleja enfermedad^{7,8}. El por qué de la pérdida de eficacia en la investigación traslacional entre el modelo animal y el humano ha sido discutido en numerosos trabajos, encontrando importantes deficiencias en los modelos experimentales⁹⁻¹². Eso ha llevado en el último año establecer recomendaciones sobre cómo adaptar la investigación básica en la patología vascular cerebral para que se adecue lo más posible a la clínica humana¹³.

Recientemente han sido publicadas las prioridades en la investigación sobre ictus para el próximo decenio¹⁴ por un grupo de expertos reunidos en Bruselas con objeto de establecer las líneas de investigación

que abordarán las necesidades científicas, clínicas e industriales más perentorias en materia de ictus. En dicha guía se establecen una serie de prioridades dirigidas a la investigación en biología cerebrovascular:

- Investigar la biología molecular y celular de la barrea hematoencefálica (BHE) para aprender a regular sus características en el endotelio del SNC como requisito para entender la fisiopatología de la microcirculación del SNC durante la fase aguda del ictus.
- Comprender los mecanismos celulares y moleculares con los que las células endoteliales de la BHE reaccionan a la isquemia cerebral focal e identificar los objetivos para proteger estas células, la BHE y la unidad neurovascular frente a la isquemia. Definir los marcadores de la alteración de la BHE y los que puedan predecir la hemorragia inducida por trombolíticos.
- Conocer la secuencia de las señales del tráfico molecular implicadas en el reclutamiento de leucocitos a través de la BHE con el fin de prevenir específicamente la migración de leucocitos

patógenos en el SNC, manteniendo al mismo tiempo la selección de posibles células reparadoras.

- Conocer y actuar sobre la angiogénesis, la vasculogénesis y la arteriogénesis antes o después de un ictus. Estudiar la interacción de la angiogénesis y la neurogénesis.
- Desarrollar modelos en animales pequeños para el ictus lacunar. Investigar mecanismos lesionales en la medida en que se relacionan con la oclusión de vasos de pequeño tamaño.

Basándonos en estas líneas generales repasaremos los últimos avances en la biología molecular de la isquemia aguda, la biología molecular de la recuperación cerebral tras el ictus, la biología molecular del preconditionamiento isquémico y, por último, los avances en la genómica de la enfermedad vascular cerebral.

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ISQUEMIA AGUDA

En la última década se ha producido un gran número de trabajos de investigación básica que han profundizado en el conocimiento de la biología molecular de la cascada isquémica (fig. 1). Dentro de ella se pueden destacar tres aspectos fundamentales: la excitotoxicidad inducida por la isquemia, la inflamación originada en la fase aguda de la isquemia y el concepto de “unidad neurovascular”.

Excitotoxicidad inducida por la isquemia

Está ampliamente aceptado que el factor crítico determinante de la muerte neuronal durante la isquemia cerebral es la progresiva acumulación de sodio y calcio intra-

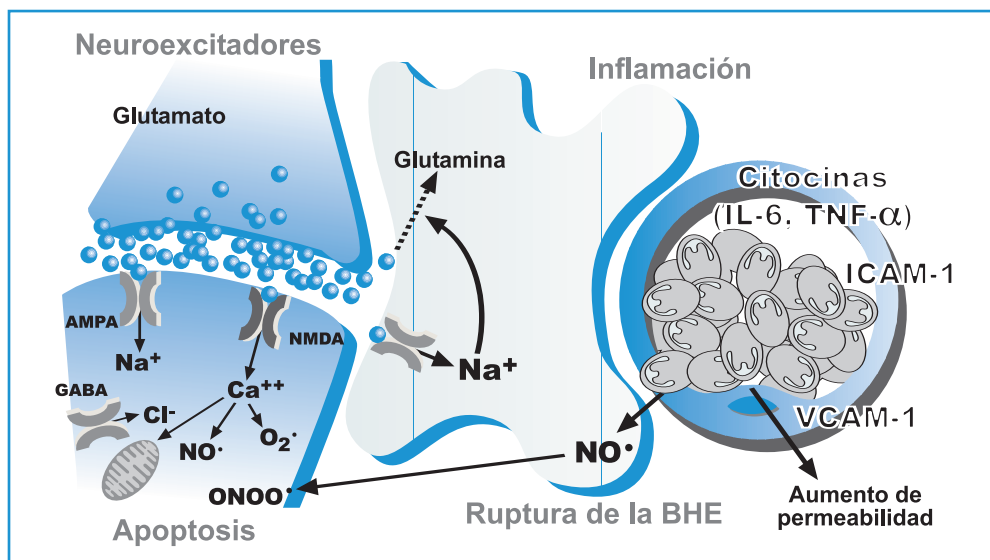


Fig. 1. Mecanismos implicados en la biología molecular de la fase aguda de la isquemia cerebral.



celular, que es capaz de inducir muerte neuronal por necrosis o apoptosis en neuronas vulnerables. Altas concentraciones de sodio intracelular inducen el edema citotóxico y la desorganización microtubular, fenómenos que conducen a la necrosis celular¹⁵. Cambios en los niveles citoplasmáticos de calcio van a poner en marcha diversas cascadas intracelulares como el estrés oxidativo o nitrosativo, la disfunción mitocondrial o la activación de proteasas que van a llevar al daño neuronal. Desde que Olney¹⁶ postuló el efecto neurotóxico del glutamato, numerosos trabajos han demostrado cómo durante las primeras fases de la isquemia se va a producir una entrada masiva de calcio y sodio en el interior neuronal a través de los receptores glutamatérgicos; esto es lo que se ha venido a llamar el paradigma de la excitotoxicidad mediada por glutamato¹⁷. Sin embargo, en los últimos años está siendo objeto de numerosas críticas, ya que a pesar de que los antagonistas de los receptores de glutamato de primera, segunda y tercera generación han demostrado buenos resultados en los modelos de isquemia cerebral animal han fallado en la neuroprotección en humanos¹⁸. En los tres últimos años, algunos experimentos básicos han cambiado las ideas sobre el paradigma neuroexcitatorio. Estos trabajos han demostrado la existencia de nuevas proteínas membrana-plasmáticas encargadas en la homeostasis del calcio y del sodio directamente implicadas en la isquemia cerebral¹⁹⁻²¹. Dichas proteínas pueden ser las responsables del mecanismo de muerte celular mediado por calcio durante la isquemia cerebral, estableciéndose una nueva teoría neurotóxica noglutamatérgica²².

Inflamación en la isquemia aguda

“Inflamación” es un término que engloba un complejo proceso en el que están imbricados mecanismos celulares, hormonales y bioquímicos, sistémicos y organoespecíficos. Existe una numerosa evidencia experimental que apoya el papel de la inflamación, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en la enfermedad vascular cerebral²³. Un objetivo de numerosos trabajos de investigación ha sido la búsqueda de marcadores inflamatorios que predigan la aparición de un ictus o el pronóstico en el caso de que se produzca (tabla I). En los últimos años han sido descritos otros marcadores en relación con la isquemia cerebral. La PARK7 es una chaperona activada por el estrés oxidativo que se eleva en plasma en los primeras tres horas tras el ictus y que tiene una sensibilidad diagnóstica entre el 54% y el 91% y una especificidad del 80-97%²⁴. La nucleosida difosfatocinasa A (NDKA) es una proteína similar con una sensibilidad entre el 70% y el 90% y una especificidad entre el 90-97%²⁴. La adiponectina es una adipocitocina con actividad antiinflamatoria y antiaterogénica que se correlaciona de forma inversa con el volumen del infarto y el pronóstico en pacientes con ictus isquémico²⁵. Los niveles plasmáticos de los ligandos endógenos de los receptores PPAR γ (15-dPGJ2) muestran una importante actividad antiinflamatoria²⁶ y se han asociado como marcadores independientes de pronóstico en la fase aguda del ictus, y con menor volumen del infarto²⁷. Dichos receptores PPAR γ son estimulados exógenamente por fármacos como las estatinas que han demostrado un papel importante en la fase aguda del ictus²⁸.

Tabla I

Marcadores inflamatorios implicados en el ictus isquémico

Marcadores inflamatorios

- Proteína C reactiva ultrasensible (PCR us)
- Fibrinógeno
- Amiloide sérico A
- Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9)
- Selectina P
- Fracción soluble del CD40 ligando
- Mieloperoxidasas
- Molécula de adhesión vesicular 1 (BCAM-1)
- Molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1)
- Factor de necrosis tumoral alfa (TND- α)
- Interleucinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6 e IL-8).

Unidad neurovascular

La unidad neurovascular (UNV) es un nuevo concepto que engloba una estructura anatómico funcional formada por la célula endotelial de los vasos intracraneales, el astrocito y la neurona. Las interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular durante la fase aguda de la isquemia cerebral son objeto de numerosos trabajos de investigación en los últimos años. La disfunción de la UNV después del ictus va a ser la responsable de la disrupción de la barrera hematoencefálica, condicionando el edema cerebral o la transformación hemorrágica²⁹ así como la amplificación de la respuesta inflamatoria en el ictus agudo³⁰. La pérdida de homeostasis entre las células y la matriz extracelular de la UNV va a iniciar múltiples cascadas bioquímicas que van a condicionar la muerte celular²⁹.

Las proteasas de la matriz extracelular son un grupo de enzimas responsables de la alteración de la homeostasis de la UNV

tras ser activadas en la isquemia cerebral. El papel de las metaloproteasas (MMP) y el activador del plasminógeno en la isquemia aguda han sido ampliamente estudiados en los últimos diez años. Las MMP comprenden una familia de zinc-endopeptidasas capaces de degradar los elementos esenciales de la matriz extracelular del SNC³¹. Su papel en el infarto cerebral dual; por un lado, en la fase aguda del ictus las MMP van a mediar en el daño tisular a través de la rotura de la barrera hematoencefálica causando la muerte celular. También desempeñan un papel muy importante en las complicaciones derivadas del tratamiento fibrinolítico³². Por otro lado en fases más evolucionadas del infarto cerebral van a tener un papel muy importante en las tareas de recuperación cerebral. Las MMP van a degradar y eliminar diferentes sustratos de la matriz extracelular y promover la liberación de factores de crecimiento y señalizaciones para células madres que van a ser las responsables del proceso de neuroreparación³³ (fig. 2). Además de los moduladores de la homeostasis de la matriz extracelular, cada vez son más los trabajos experimentales que destacan la importancia de la comunicación entre las células endoteliales activadas y la microglía desempeñando una función en la activación de vías apoptóticas durante la fase aguda y de antiapoptóticas durante la reparación neuronal³⁴.

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA REPARACIÓN CEREBRAL

Aquellos pacientes que consiguen sobrevivir a un ictus en su fase aguda y son



datos de alta van entrar en la fase crónica de la enfermedad. En esta fase van a experimentar una lenta mejoría que se desarrollará a lo largo de las primeras semanas o incluso meses. Este periodo activo es conocido como neuroreparación y hasta el momento conocemos poco del mecanismo implicado en el mismo (fig. 3). El fundamento terapéutico de la neuroreparación se basa en la reconstrucción parcial del tejido dañado, potenciando mecanismos celulares endógenos (neurogénesis y angiogénesis) a través del aporte de células exógenas (trasplante celular)³⁵.

Neurogénesis y angiogénesis

En modelos animales se ha observado que, tras el daño cerebral producido por la isquemia, se va a producir un incremento

en la expresión de genes que se expresan habitualmente en fases de embriogénesis o desarrollo cerebral³⁶ (fig. 4). Estas observaciones sugieren que existe un mecanismo activo neuroreparador. Numerosos trabajos experimentales han confirmado la aparición de neurogénesis en tejido cerebral adulto en áreas periventriculares y en la zona del *girus* dentado³⁷⁻⁴². Por otro lado, la formación de nuevos vasos sanguíneos, angiogénesis, es muy prominente en el área periinfarto⁴³⁻⁴⁵. Tanto la angiogénesis como la neurogénesis desarrollada tras el infarto cerebral van a crear un medio dentro del área necrótica que va a ser responsable en gran medida de la mejoría funcional de los pacientes en la fase crónica^{46,47}. La investigación en neuroreparación abre una línea terapéutica nueva coincidiendo con la decepción que ha mostrado la terapia neuroprotectora en los últimos años. Un conoci-

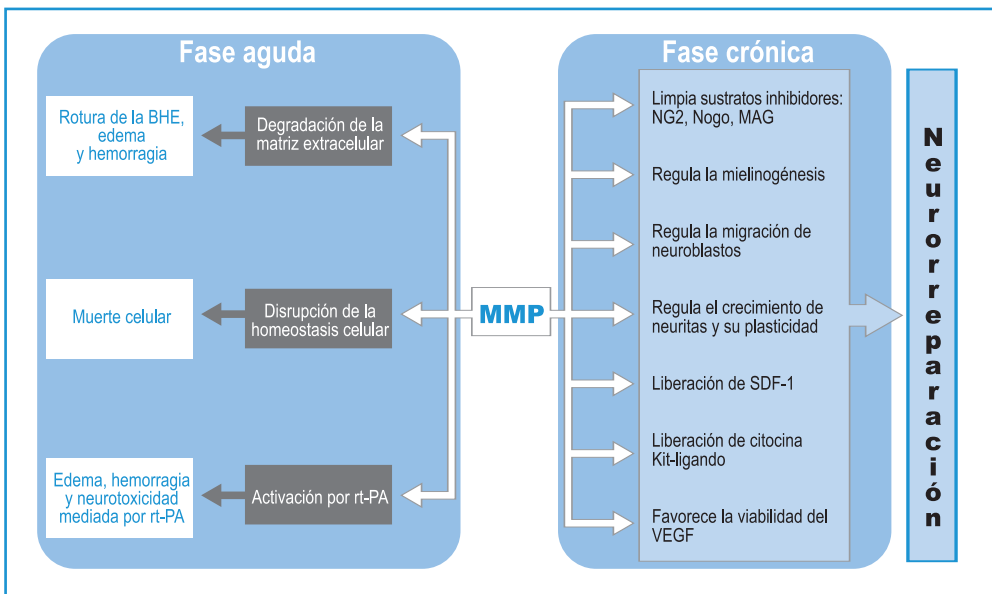


Fig. 2. Efecto dual de las MMP en la bibliografía del ictus. Modificado de Zhao QB et al³³.

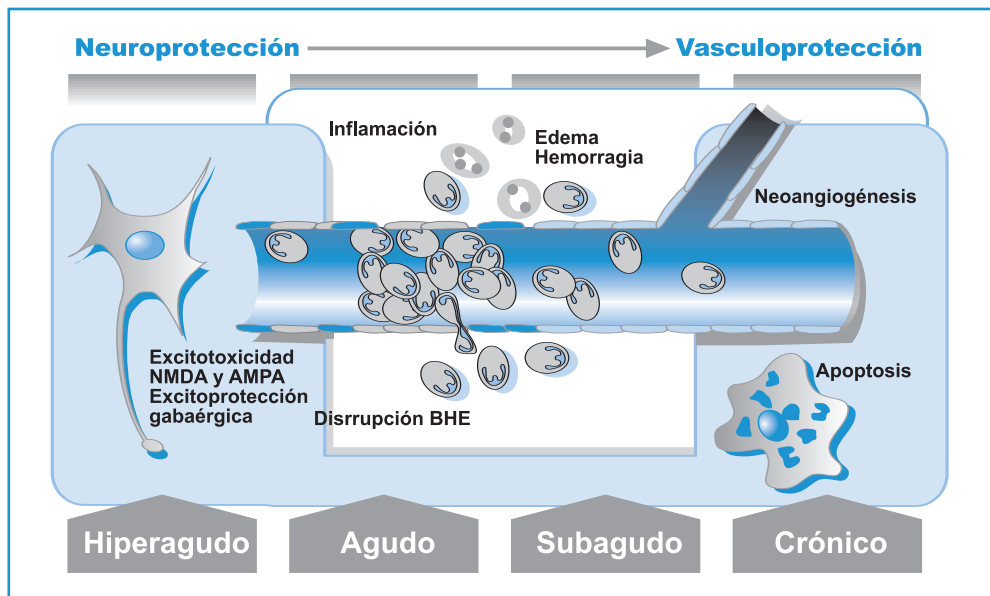


Fig. 3. Mecanismos implicados en la neurorreparación.

miento de los mecanismos que subyacen a la neurorreparación ha abierto una línea prioritaria de investigación y terapéutica para los próximos años⁴⁸.

AVANCES EN INVESTIGACIÓN GENÉTICA

Los estudios realizados en gemelos, familias y modelos animales han proporcionado la evidencia suficiente de que el ictus tiene un componente genético, aunque el alcance de dicho componente es incierto. En los primeros estudios realizados en gemelos se encontró que los monocigóticos presentaban un mayor riesgo de ictus que los dicigóticos⁴⁹. También se ha encontrado en estudios de casos y controles que la historia familiar incrementa el riesgo de ictus

en un 75%⁵⁰. Sin embargo, la predisposición genética del ictus varía dependiendo de la edad y del subtipo de ictus. El componente genético es más intenso en los pacientes menores de 70 años^{51,52} y en los de pequeño y gran vaso que en los criptogénicos y cardioembólicos⁵¹⁻⁵³.

Pero además de los estudios de asociaciones existen casos concretos de ictus que siguen un patrón de herencia mendeliana, como la arteriopatía autosómica dominante, con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL), en la que se ha identificado como responsable el gen NOTCH3, localizado en el cromosoma 19⁵⁴, o la citopatía mitocondrial, caracterizada por encefalopatía con episodios similares a ictus y acidosis láctica (MELAS), en la que se ha encontrado una mutación en el ADN mitocondrial⁵⁵. Incluso hay algunas enfermedades genéticas que

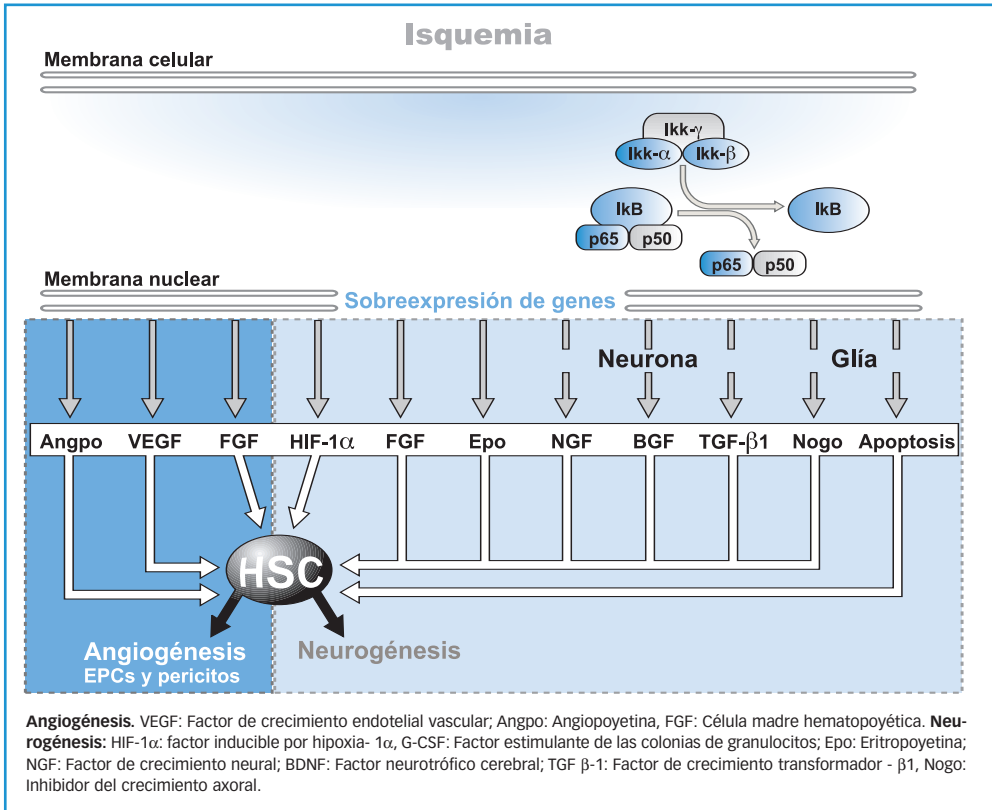


Fig. 4. Genes implicados en la angiogénesis y neurogénesis tras la isquemia cerebral.

cursan con alteraciones del tejido conjuntivo en las que existe un riesgo mayor de ictus debido a disecciones arteriales, como el síndrome de Marfan⁵⁶ o la enfermedad de Fabry⁵⁷.

Los diversos factores genéticos del ictus pueden actuar de diferentes maneras. Pueden contribuir al desarrollo de factores de riesgo como la hipertensión, la diabetes o la hiperhomocisteinemia, interactuar con factores ambientales o contribuir directamente sobre fenotipos intermedarios, como la aterosclerosis. Los factores genéticos también pueden afectar a la latencia del ictus, al tamaño del infarto y al pronóstico funcional.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona ejerce un efecto sobre la presión arterial sistólica. Existen evidencias de que variaciones genéticas en este sistema contribuyen al riesgo de ictus. El principal gen estudiado es el del la enzima convertidora de angiotensina. La enzima convertidor de angiotensina ejerce su efecto actuando sobre el tono vascular, la función endotelial y la proliferación de las células musculares lisas. Se ha relacionado el polimorfismo inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina con un riesgo mas elevado de cardiopatía isqué-



mica⁵⁸ y de ictus^{59,60}. En un metaanálisis se encuentra que el genotipo D/D se relaciona con un incremento leve del riesgo de ictus⁶¹; sin embargo, estudios posteriores no encuentran dicha asociación^{62,63}. Ningún estudio ha encontrado un incremento del riesgo superior al 20%, lo que sugiere que el alelo D ejerce un efecto discreto en el riesgo de ictus.

Otros factores relacionados con la función endotelial que han sido objeto de estudio son los genes codificantes de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Los estudios realizados son contradictorios, ya que algunos autores han encontrado una asociación entre el polimorfismo Glu298Asp de la eNOS y un mayor riesgo de fenómenos isquémicos⁶⁴, aunque otros no han encontrado dicha asociación⁶⁵. También se ha visto que los ratones deficientes en eNOS son más sensibles a la isquemia cerebral focal⁶⁶.

Los defectos genéticos en el metabolismo de la homocisteína pueden conducir a una hiperhomocisteinemia importante y a la aterosclerosis, por lo que ha sido un gen de interés. La variante genética C677T de la metilén tetrahidrofolato reductasa, una enzima importante en el metabolismo de la homocisteína, ha sido relacionada con el ictus isquémico. El genotipo TT, presente en el 10% de la población, incrementa la dosis total de homocisteína en un 20% y aumenta el riesgo de ictus en relación con el genotipo CC^{67,68}. Se han propuesto numerosos genes relacionados con la hemostasia y la trombosis como posible causa de ictus. Debido a que los niveles elevados de fibrinógeno relacionan la aterosclerosis y mecanismos protrombóticos, éste ha sido un candi-

dato importante en la búsqueda de factores genéticos. El genotipo homocigótico AA del polimorfismo G-A 455 del gen del fibrinógeno produce unos niveles más elevados de fibrinógeno y se ha encontrado una mayor prevalencia en los casos de ictus de gran vaso²². También se ha encontrado que la variante PIA2 en el receptor plaquetario del fibrinógeno es un factor de riesgo de ictus importante en pacientes menores de 50 años⁶⁹. Los estudios relacionados con la aterosclerosis han tenido gran importancia en la búsqueda de genes relacionados con el ictus. La fosfodiesterasa 4D (PDE4D) degrada selectivamente el AMP cíclico reduciendo sus niveles, lo que se asocia con un incremento de la proliferación y migración de las células musculares lisas, lo cual se ha relacionado con la aterosclerosis. Se han relacionado los polimorfismos en la PDE4D con un mayor riesgo de ictus de gran vaso y cardioembólico⁷⁰. Otro gen relacionado con un mayor riesgo de ictus e infarto de miocardio es el ALOX5AP⁷¹. El gen ALOX5AP codifica la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa, esencial para la conversión del ácido araquidónico en leucotrieno A4, el cual ejerce un papel importante en la quimotaxis de leucocitos y la respuesta inflamatoria que desencadena la aterosclerosis.

Se están realizando estudios en los que se hace referencia al pronóstico del ictus y la respuesta farmacológica en relación con factores genéticos. Se ha encontrado que un polimorfismo en el gen que codifica el transportador del glutamato EAAT2 se relaciona con la presencia de deterioro neurológico⁷². La presencia de este polimorfismo se asocia con un aumento de la concentración plasmática de glutamato, con lo que se



incrementa el daño debido a mecanismos de excitotoxicidad. Asimismo, se están realizando estudios farmacogenéticos en los cuales se investigan variaciones genéticas que determinen diferentes respuestas a fármacos, como los polimorfismos en los genes de la enzima microsomal hepática P450 2C9 (CYP2C9) o del complejo 1 vitamina K epóxido reductasa (VKORC1), que influyen en la sensibilidad a la warfarina^{73,74}.

En resumen, se puede afirmar que en los últimos años asistimos a un incremento muy importante en la investigación básica de la enfermedad cerebrovascular. Los modelos

animales confirman mecanismos patogénicos de la isquemia cerebral, aunque abren nuevas interrogantes y, por consiguiente, nuevas vías de investigación que ayuden a explicar un proceso tan complejo y heterogéneo como la isquemia cerebral. La investigación traslacional continúa siendo complicada y, por el momento, no logra completar las expectativas previstas. Es verdad que se ha recorrido mucho camino en la investigación de la isquemia cerebral, pero no es menos cierto que todavía queda mucho camino por recorrer en el excitante mundo de la investigación de la patología cerebrovascular.

Bibliografía

1. Ward NS, Cohen LG. Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Arch Neurol.* 2004; 61: 1844-8.
2. Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx.* 2006; 3: 466-73.
3. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 399-415.
4. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 391-7.
5. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 248-54.
6. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 775-86.
7. Fisher M, Tatlisumak T. Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: Con *Stroke.* 2005; 36: 2324-5.
8. Kaste M. Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: Pro *Stroke.* 2005; 36: 2323-4. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 2003; 4: 399-415.
9. Heard K, Bebartha VS, Lowensten SR. Methodological standards in human vs animal clinical trials. *Jama.* 2005.p. 294-40; author reply 40-1.
10. Bebartha V, Luyten D, Heard K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? *Acad Emerg Med.* 2003; 10: 684-7.
11. Pound P, Ebrahim S, Sanderock P, Bracken MB, Roberts Y. Where is the evidence that animal research benefits humans? *Bmj.* 2004; 328: 514-7.
12. Samsa GP, Matchar DB. Have randomized controlled trials of neuroprotective drugs been underpowered? An illustration of three statistical principles. *Stroke.* 2001; 32: 669-74.
13. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26: 1465-78.
14. Meairs S, Wahlgren N, Dirnagl U, Lindvall O, Rothwell P, Baron JC, et al., Stroke research priorities for the next decade a representative view of the european scientific community. *Cerebrovasc Dis.* 2006; 22: 75-82.
15. Syntichaki P, Tavernarakis N, The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 672-84.
16. Olney JW, Ho OL, Rhee V, DeGubareff T. Letter: neurotoxic effects of glutamate. *N Engl J Med.* 1973; 289: 1374-5.
17. Choi DW, Koh JY, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by nmda antagonists. *J Neurosci.* 1988; 8: 185-96.
18. Ikonomidou C, Turski L. Why did nmda receptor antagonist fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 2002; 1: 383-6.
19. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, et al. Neuroprotection in ischemia: Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell.* 2004; 118: 687-98.
20. Pignataro G, Gala R, Cuomo O, Trotiglione A, Giaccio L, Castaldo P, et al. Two sodium/calcium exchanger gene products, nex1 and nex3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2004; 35: 2566-70.
21. Aarts M, Lihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, et al. A key role for trpm7 channels in anoxic neuronal death. *Cell.* 2003; 115: 863-77.
22. Annunziato L, Cataldi M, Pignataro G, Secondo A, Molinaro P. Glutamateindependent calcium toxicity: Introduction. *Stroke.* 2007; 38: 661-4.
23. Hallenbeck JM, Hansson GK, Becker KJ. Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends Immunol.* 2005; 26: 550-6.
24. Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, Burgess JA, Walter N, Hochstrasser DF, et al. Park 7 and nucleoside diphosphate kinase a as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem.* 2005; 51: 2043-51.
25. Efstathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, Gratsias YE, Pefanis AV, Mountokalakis TD. Plasma adipo-



- nectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke*. 2005; 36: 1915-9.
26. Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, Bosca L, Castillo J, Dávalos A, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin j2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26: 218-29.
 27. Blanco M, Moro MA, Dávalos A, Leira R, Castellanos M, Serena J, et al. Increased plasma levels of 15-deoxydelta prostaglandin j2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke*. 2005; 36: 1189-94.
 28. Nombela F, Blanco M, López-Manzanares L, Rodríguez-Yáñez M, Silva Y, Millán M, et al. The effect of statins withdrawal on stroke outcome depends on stroke subtype. *Cerebrovasc Dis*. 2006; 21(suppl. 4): 148.
 29. Lee SR, Wang X, Tsuji K, Lo EH. Extracellular proteolytic pathophysiology in the neurovascular unit after stroke. *Neurol Res*. 2004; 26: 854-61.
 30. Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J. Platelets, inflammation and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis*. 2005; 6: 931-44.
 31. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6: 931-44.
 32. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizaola I, Castillo J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003; 34: 40-6.
 33. Zhao BQ, Tejima E, Lo EH. Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke*. 2007; 38: 748-52.
 34. Han HS, Suk K. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res*. 2005; 2: 409-23.
 35. Greenberg DA. Stem cells and stroke recovery: Introduction. *Stroke*. 2007; 38: 809.
 36. Cramer SC, Chopp M. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci*. 2000; 23: 265-71.
 37. Tonchev AB, Yamashita T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 23: 292-301.
 38. Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2001; 105: 33-41.
 39. Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferreiro DM. Rat replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002; 8: 963-70.
 40. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002; 8: 963-70.
 41. Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Goussev A, Zhang L, et al. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24: 441-8.
 42. Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, et al. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke*. 2004; 35: 1454-9.
 43. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, et al. Correlation of vegf and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 379-92.
 44. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. Vegf enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000; 106: 829-38.
 45. Lin TN, Wang CK, Cheung WM, Hsu CY. Induction of angiopoietin and tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20: 387-95.
 46. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000; 425: 479-94.
 47. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-



- renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004; 304: 1338-40.
48. Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, et al. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2006; 21 (Suppl. 2): 54-63.
 49. Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke*. 1992; 23: 221-3.
 50. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*. 2004; 35: 212-27.
 51. Schulz UG, Flossmann E, Rothwell PM. Heritability of ischemic stroke in relation to age, vascular risk factors and subtypes of incident stroke in population-based studies. *Troke*. 2004; 35: 819-24.
 52. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study. *Stroke*. 2003; 34: 1364-9.
 53. Jood K, Ladenvall C, Rosengren A, Blomstrand C, Jern C. Family history in ischemic stroke before 70 years of age: the sahlgrenska academy study on ischemic stroke. *Stroke*. 2005; 36: 1383-7.
 54. Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet*. 1993; 3: 256-9.
 55. Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, et al. Melas: clinical features biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol*. 1992; 31: 391-8.
 56. Spittell PC, Spittell JA Jr, Joyce JW, Tajik AJ, Edwards WD, Schaff HV, Stanson AW. Clinical features and differential diagnosis of aortic dissection: experience with 236 cases (1980 through 1990). *Mayo Clin Proc*. 1993; 68: 642-51.
 57. Crutchfield KE, Patronas NJ, Dambrosia JM, Frei KP, Banerjee TK, Barton NW, et al. Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with fabry disease. *Neurology*. 1998; 50: 1746-9.
 58. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992; 359: 641-4.
 59. Markus HS, Barley J, Lunt R, Blanc JM, Jeffery S, Carter ND. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism. A new risk factor for lacunar stroke but no carotid atheroma. *Stroke*. 1995; 26: 1329-33.
 60. Margaglione M, Celentano E, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, et al. Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*. 1996; 16: 304-9.
 61. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Metaanalysis of genetic studies in ischemic stroke: Thirty-two genes involving approximately 18.000 cases and 58.000 controls. *Arch Neurol*. 2004; 61: 1652-61.
 62. Brenner D, Labreuche J, Poirier O, Cambien F, Amaerenco P. Renin-angiotensin-aldosterone system in brain infarction and vascular death. *Ann Neurol*. 2005; 58: 131-8.
 63. tuncer N, Tuğlular S, kilic G, Sazci A, Us O, Kara I. Evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of ischaemic stroke. *J Clin Neurosci*. 2006; 13: 224-7.
 64. Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. Association between the glu298asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. The genic investigators. *Stroke*. 2000; 31: 1634-9.
 65. MacLeod MJ, Dahiyat MT, Cumming A, Meiklejohn D, Shaw D, St Clair D. No association between glu/asp polymorphism of nos3 gene and ischemic stroke. *Neurology*. 1999; 53: 418-20.
 66. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*. 1997; 28: 1283-8.
 67. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet*. 2005; 365: 224-32.