

ENDOTELIO Y ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR ISQUEMICA

Dra. María Pérez L. Barreto

UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA. LOS ANGELES, CALIFORNIA

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) constituyen la tercer causa de muerte y la primera causa de incapacidad prolongada en adultos en el mundo desarrollado (1). El conocimiento de los mecanismos subyacentes de la isquemia cerebral es aún limitado. Aproximadamente el 80 % de los ACV son isquémicos y hasta recientemente no existían modalidades terapéuticas eficaces para su tratamiento. Los resultados favorables del uso del activador tisular del plasminógeno (t-PA) cambiaron radicalmente el manejo de los pacientes con ACV isquémicos que arriban al hospital dentro de las 3 primeras horas del comienzo de los síntomas (2). El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la isquemia y la injuria causada por reperfusión del área isquémica han abierto nuevos caminos en el desarrollo de estrategias terapéuticas (3).

La pared de los vasos sanguíneos está compuesta por una delgada lámina de células endoteliales, membrana basal, yuxtapuesta a una capa media de células musculares y la adventicia de tejido conectivo que las envuelve.

Durante décadas el endotelio fue considerado una capa inerte de células. En 1980, Furchgott y Zawadsky demostraron que la integridad del endotelio es fundamental para el normal funcionamiento de los vasos sanguíneos (4).

Las células endoteliales están dispuestas entre la sangre y la pared de los vasos, actuando como sensores y transductores dentro de ese microambiente. El endotelio, se transforma así en una pieza clave en el control de las funciones vasculares. Este regula activamente el tono vascular y la permeabilidad, el balance entre coagulación y fibrinólisis, la composición de la matriz subendotelial, la extravasación de los leucocitos y la proliferación de las células de la capa muscular (5). Para llevar a cabo estas funciones, el endotelio produce componentes de la matriz subendotelial y una

variedad de mediadores como el óxido nítrico (ON), prostaglandinas (Pg), endotelinas (ET), angiotensina II, t-PA, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I), factor de von Willebrand (vWF), moléculas de adhesión, citoquinas, proteína C (PC) y trombomodulina (TM). Normalmente, el endotelio tiene una acción vasodilatadora y discretamente anticoagulante, proceso donde el ON y el sistema de la TM-PC juegan un rol clave. (6, 7, 8) Las células endoteliales normalmente inhiben la adhesión y agregación plaquetaria a través de la producción de prostaciclina y ON. Limitan la activación de la cascada de la coagulación por medio de las interacciones entre el sistema TM-PC y heparan sulfato-antitrombina III, y regulan la fibrinólisis a través de la producción de t-PA y su inhibidor PAI-I (9).

DISFUNCION ENDOTELIAL

La disfunción del endotelio se establece cuando alguna de estas propiedades, ya sea en forma basal o secundaria a estímulos, se alteran y resultan inapropiadas para el mantenimiento y normal funcionamiento del sistema (10). Los cambios claves que llevan a la disfunción o activación de las células endoteliales son: pérdida de la integridad y del control del tono vascular, expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, transformación en una superficie protrombótica y la producción de citoquinas. De este modo la disfunción o activación de las células endoteliales predispondría a la vasoconstricción, formación de trombo plaquetario, e infiltración de células inflamatorias (11, 12).

La función endotelial in vivo es evaluada por la capacidad vasodilatadora del endotelio en condiciones basales o luego de la administración de agentes precursores, donadores o inhibidores del ON. Existen además métodos de laboratorio que permiten medir niveles séricos de moléculas y proteínas asociadas a la producción de ON. Bhagat y col. han propuesto una serie de deter-

minaciones que serían útiles en la valoración de la función endotelial (13) (Tabla 1).

En individuos con hipertensión se observa alteración en la producción endotelial de ON, dismi-

Tabla 1
Potenciales determinaciones en la evaluación de la función endotelial.
(Extraído de Stehouver y col. ref. 13)

Determinación	Interpretación
Aumento del pasaje transcápilar de albúmina marcada administrada IV	Incremento de la permeabilidad a macromoléculas
Alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio.	Decremento de la producción de sustancias vasodilatadoras como ON
Endotelinas *	Incremento de la síntesis de sustancias vasoconstrictores
Factor de Von Willebrand *	Incremento de la actividad protrombótica-procoagulante
sTrombomodulina *	Disminución de la actividad anticoagulante
t-PA y PAI-I *	Decremento de la actividad profibrinolítica
sE-selectina, sI-CAM y sVCAM-1 *	Incremento de la permeabilidad a los leucocitos, activación de la inflamación
* Aumento de los niveles en plasma o serum s =soluble VCAM=moléculas de adhesión de las células vasculares.	

El uso de estas determinaciones como estimativas de las funciones del endotelio, proviene de investigaciones que han asociado patologías vasculares, con altas concentraciones plasmáticas de proteínas derivadas del endotelio y trastornos de la capacidad vasodilatadora en individuos con patologías que involucran injuria endotelial como aterosclerosis, diabetes, hipertensión y tabaquismo (13, 14, 15, 16).

En la aterosclerosis las ox-LDL ocasionan un incremento de la permeabilidad endotelial, expresión de moléculas de adhesión con infiltración de monocitos y linfocitos T al espacio subendotelial y cambios en la producción de ON. El endotelio se transforma así en una superficie con características procoagulantes y vasoconstrictoras favoreciendo el desarrollo de obstrucción vascular (14). En pacientes con diabetes se observa depósito de productos derivados del metabolismo de la glucosa a nivel subendotelial, que se asocia con expresión endotelial del FT (factor tisular), alteración del sistema TM-PC y disminución de la producción de t-PA, alterando así las propiedades fibrinolíticas y anticoagulantes del endotelio (13).

nación de la capacidad vasodilatadora e incremento de la resistencia periférica (15). Se ha descrito también, alteraciones de la coagulación con disminución de la actividad del t-PA, y TM, elevación del fibrinógeno, incremento del PAI-1 y de la agregación plaquetaria (17).

Se postula que la nicotina y sus productos relacionados predispondrían a la trombosis a través de un desbalance entre la coagulación y el sistema fibrinolítico (18, 19).

TONO VASCULAR

El endotelio produce y libera factores que regulan el tono vascular en condiciones basales y en respuesta a estímulos como la isquemia, sepsis o procesos inflamatorios. La regulación del tono está dada por un balance entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores.

Los factores dilatadores derivados del endotelio son óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE), prostaciclina y

ADP; los factores vasoconstrictores más importantes son endotelinas (ET) y ácido araquidónico (20). Nos referiremos aquí principalmente al ON y a las ET. (Figura 1).

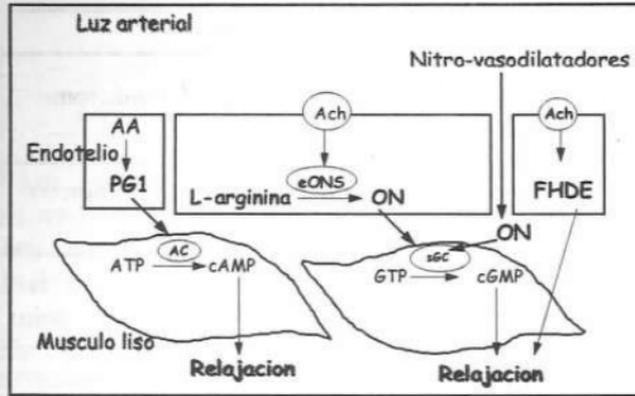


Figura 1: Factores vasodilatadores dependientes del endotelio. Ver texto para la explicación. Ach: acetilcolina. AA: ácido araquidónico. PG1: prostaglandinas. FHDE: factor hiperpolarizante derivado del endotelio. ON: óxido nítrico. AC: enzima adenil ciclasa. ATP: adenosil trifosfato. ADP: adenosil difosfato. GTP: guanidil trifosfato. cGMP: guanidil difosfato cíclico. sGC: forma soluble de la guanilato ciclasa.

Furchgott y Zawadsky demostraron que la integridad del endotelio juega un importante rol en el mantenimiento del tono vascular a través de la producción del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (3). Más tarde Palmer y colaboradores identificaron al EDRF como ON, el cual es producido por las células endoteliales estimuladas por agentes vasoactivos como acetilcolina y bradikina (21). El ON es sintetizado a partir de la oxidación de L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) (22). Tres isoformas de ONS han sido descritas: neuronal (nNOS), macrófago inmunológica (iNOS) y endotelial (eNOS). El ON producido a nivel del endotelio difunde al músculo liso vascular donde estimula a la forma soluble de la guanilato ciclasa, incrementa la producción de GMP cíclico llevando a la relajación muscular y vasodilatación (20, 23). El nitroprusiato y la nitroglicerina actúan como donadores de ON produciendo relajación de las células musculares a través del incremento de GMPc, sin afectar la producción de ON endotelial (24).

Las células endoteliales producen cantidades basales de ON que regulan la presión arterial, mantienen el tono de la microvasculatura a nivel cerebral y serían los principales mediadores de la vasodilatación cerebral secundaria a hipercapnea (25). Esta función vasodilatadora y potencialmente be-

neficia del ON en condiciones de isquemia cerebral se contraponen con la acción potencialmente perjudicial del ON neuronal que actúa como mediador de neurotoxicidad (26, 27). Resultados de estudios utilizando donadores de ON (L-arginina)

han demostrado que en los estadios tempranos de la isquemia cerebral el incremento de la producción endotelial de ON tendría un efecto beneficioso (28). El ON facilita el flujo sanguíneo a través de su acción vasodilatadora, de la inhibición de la formación del tapón plaquetario y de la adhesión leucocitaria al endotelio (29). Al mismo tiempo, un incremento de la entrada de calcio dentro de las neuronas isquémicas lleva a la persistente activación de la forma neuronal de ONS y producción continua de ON (30). Grandes cantidades de ON contribuyen así al daño neuronal y resultan en un incremento del área isquémica.

En etapas tempranas de la isquemia cerebral, los efectos beneficiosos del ON endotelial sobre la vasculatura cerebral superarían los potenciales efectos neurotóxicos del ON de origen neuronal. En etapas tardías (>6 horas) de la injuria, la forma inducible ONS es expresada y grandes cantidades de ON son producidas a nivel tisular llevando a la progresión de la isquemia (26, 27, 31). En este momento, la potencial acción protectora del ON endotelial decrecería predominando el efecto neurotóxico del ON neuronal. De este modo el rol de ON durante la isquemia cerebral resulta de un delicado balance entre las cantidades de ON producido, del compartimento que lo genera (endotelial o neuronal) y del tiempo de evolución de la isquemia.

El endotelio produce también otros factores vasodilatadores. La prostaciclina, metabolito del ácido araquidónico, ocasiona vasodilatación de los vasos cerebrales y es también un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (20). El factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE), fue descrito por primera vez en humanos por Nakashima y colaboradores (32). El FHDE ejerce su acción vasodilatadora principalmente a nivel de la microcirculación y su efecto hiperpolarizante estaría mediado por la activación de los canales de potasio (calcio dependiente) (33). Se ha observado que el FHDE tendría un importante rol en los trastornos de la vasodilatación en individuos con hipercolesterolemia y en el envejecimiento.

Las endotelinas son una familia de péptidos con actividad principalmente vasoconstrictora. Se han descrito hasta la fecha a la ET-1, ET-2 y ET-3 (34, 35). La ET-1 es la única producida a nivel endotelial y en la musculatura vascular. Es considerada como una de las más potentes sustancias vasoconstrictoras. Su producción aumenta durante la isquemia. Aproximadamente un 75 % de la ET-1 es liberada en forma abluminal, aunque concentraciones plasmáticas de la misma son útiles como marcadores en enfermedades vasculares. ET-2 y ET-3 son producidas a nivel hepático, intestinal, miocárdico y placentario. Se han descrito dos tipos de receptores, tipo A y tipo B.

El tipo A tiene alta afinidad por la ET-1, ubicado principalmente a nivel del músculo liso vascular, es el mediador de la respuesta vasoconstrictora de la misma. El tipo B expresado a nivel endotelial, se une a las ET-3 y ET-1. Su activación lleva a la dilatación vascular, acción mediada por la interacción con el sistema L-arginina-ON y la activación de los canales de potasio (35).

Durante la isquemia habría un aumento en la producción de endotelinas, especialmente ET-1, que llevarían a la vasoconstricción e incremento del área isquémica. En pacientes con ACV agudos se ha observado un incremento de las concentraciones plasmáticas y en LCR de ET-1, siendo esto mayor durante las primeras 6 a 24 horas (36, 37). Altas concentraciones de ET dentro de las 24 horas del ACV han sido asociadas con peor pronóstico. En individuos con insuficiencia cardíaca congestiva se ha observado un incremento de las concentraciones plasmáticas de ET, relacionándose esto con la severidad de la enfermedad (38).

COAGULACION

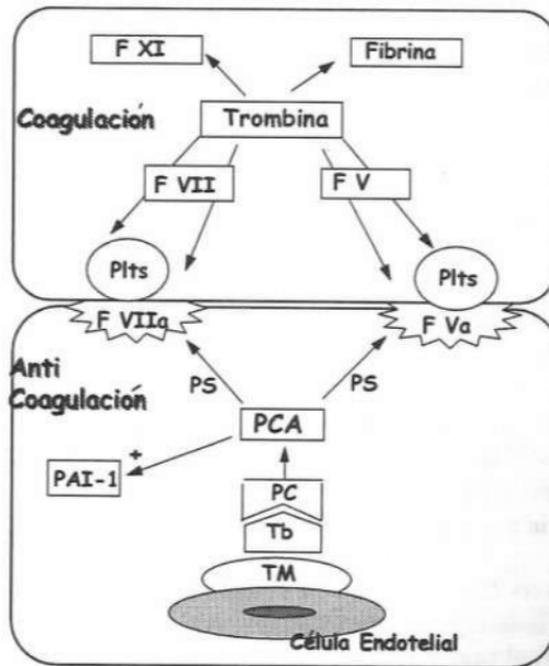
En condiciones normales, el endotelio vascular se presenta como una superficie anti-trombótica y pro-fibrinolítica que limita la trombosis y asegura el flujo sanguíneo. Las alteraciones de la integridad endotelial, cambios en las características del flujo sanguíneo o en la generación de factores asociados a la coagulación contribuyen al desarrollo de trombosis vascular.

Las características antitrombóticas del endotelio están determinadas por los siguientes sistemas. 1) La presencia de trombosmodulina (TM), una proteína integral de la membrana de las células endoteliales, que ejerce su actividad anticoagulante a través de su relación con la trombina y la

PC; 2) la ausencia de expresión luminal del factor tisular (FT), sustancia que desencadena la cascada de la coagulación; 3) la ausencia de pasaje de los factores de la coagulación circulantes al parénquima, evitando la activación del FT; 4) las propiedades físico-químicas de la superficie endotelial que previenen la adherencia de las plaquetas, y consecuente activación de la fase intrínseca de la coagulación (9, 39, 40).

Las células endoteliales expresan en condiciones normales TM en su superficie luminal. La TM se une a la trombina formando un complejo que lleva a la activación de la proteína C (PC). La PC activada (APC), en presencia de la proteína S, se comporta como una enzima antitrombótica a través de la degradación de los factores Va y VIIIa y de la promoción de la fibrinólisis a partir de la inhibición del PAI-1 (39, 41) (Figura 2).

En pacientes con ACV agudos se han encontrado bajos niveles plasmáticos de APC en comparación con individuos con patologías no vas-



Vías de la Coagulación y anticoagulación

Figura 2: Vías de la coagulación y anticoagulación. Anticoagulación: las células endoteliales expresan TM en su superficie, que al unirse a la trombina (Tb) activan a la Proteína C (PC). La PC activada (PCA) en presencia de Proteína S inhibe al factor VII activado, factor Va y estimula la producción de PAI-1 ejerciendo así su actividad anticoagulante. Coagulación: la trombina libre en plasma, activa las plaquetas, al factor V, factor VII y XI y la formación de fibrina favoreciendo la coagulación.

culares; y los mismos se asociaron con un peor pronóstico evolutivo (42, 43).

Un elemento clave en la iniciación y amplificación de la cascada de la coagulación es el FT. El mismo se encuentra expresado a nivel de la adventicia y del parénquima cerebral. El endotelio normalmente impide el pasaje de los factores de la coagulación al parénquima. Durante la injuria endotelial hay un aumento de la permeabilidad y el plasma entra en contacto con el FT llevando a la activación de los factores VII, X y V. El Xa forma un complejo con el factor Va y ambos activan la protrombina con la consiguiente formación de trombina. Bajas concentraciones de trombina generan un incremento de los niveles endógenos de APC mientras que en altas concentraciones causa trombosis a través de la activación del factor V, VII y de la conversión de fibrinógeno en fibrina (44, 45).

La disrupción y/o "activación" del endotelio lleva a la activación plaquetaria. Las mismas se adhieren a la superficie endotelial a través de la interacción entre el factor de von Willebrand y las glicoproteínas plaquetarias. Una vez activadas se produce la degranulación y expresión de los factores de la coagulación (VIII-V) y la P-selectina. Las plaquetas agregadas, junto con los leucocitos y fibrinógeno forman el tapón plaquetario y posteriormente junto con la fibrina el coágulo. El endotelio injuriado libera también t-PA el cual activa principalmente a la fibrina unida al plasminógeno.

Cuando la fibrinólisis endógena es efectiva se produce la disolución del trombo y el restablecimiento del flujo sanguíneo del tejido dañado por la isquemia. Esto puede ir acompañado de un sangrado de tipo petequial por daño vascular, invasión de leucocitos activados y el desarrollo de injuria por reperfusión (44).

injuria aguda y por reperfusión (46). La activación de mediadores pro-inflamatorios podría asociarse al aumento transitorio del riesgo de episodios vasculares en las semanas posteriores a procesos infecciosos o inflamatorios (47, 48).

Normalmente las células endoteliales son bioquímicamente antiinflamatorias y suprimen las respuestas inflamatorias. Estas propiedades del endotelio están dadas por el balance entre los mecanismos que regulan el componente protrombótico de la inflamación, la permeabilidad vascular, la adhesión celular de los leucocitos al endotelio, la producción de sustancias quimiotácticas, que crean gradiente necesario para la migración tisular de los leucocitos, y por último, la producción de factores que interviene en la angiogénesis (49). El elemento clave en la reacción inflamatoria es la acumulación de leucocitos en los tejidos dañados.

Para migrar al parénquima los leucocitos requieren del aumento de la adhesividad y de la interacción con las células endoteliales. En condiciones normales esto no sucede debido a la "falta de oportunidades" ya que el endotelio expresa muy baja concentración de moléculas de adhesión en su superficie y segrega activamente factores como el ON y prostaglandinas que inhiben la agregación plaquetaria y la adhesión leucocitaria.

Pero esta situación cambia drásticamente cuando el endotelio es dañado por trauma, oxidación de las lipoproteínas, factores humorales que activen la coagulación, mediadores inflamatorios (citoquinas, interleucinas), toxinas o agentes infecciosos (50, 51).

La extravasación de los leucocitos es habitualmente descrita en tres diferentes pasos: rolido, adhesión y migración (52, 53) (Figura 3).

INFLAMACION

Las células endoteliales están firmemente unidas por complejas conexiones intercelulares que impiden el pasaje al parénquima cerebral de componentes del sistema inmunológico o la invasión de células neoplásicas. En los últimos años ha cobrado interés el estudio de la activación del endotelio en los procesos inflamatorios debido al rol de éste en el desarrollo de la in-

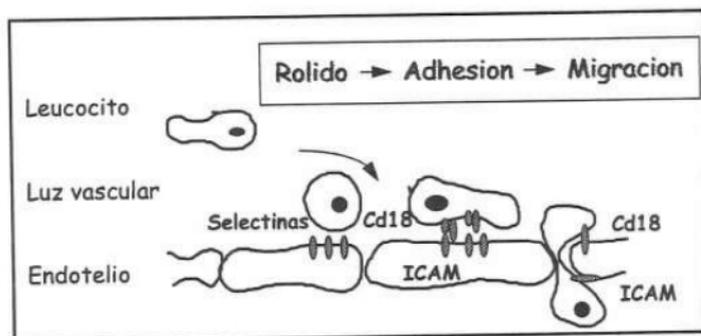


Figura 3: Gráfico de los eventos involucrados en la extravasación leucocitaria. El primer paso, rolido está mediado por la selectinas, el segundo "adhesión" por las CD-18 y las ICAMs y el tercero "migración" por las ICAMs y CD-18 (ver texto)

Durante el primer paso, los leucocitos que circulan libremente por la sangre hacen su contacto inicial con el endotelio "activado" comenzando su rolido en el sitio donde luego migrarán al parénquima. Este paso está mediado por las moléculas de adhesión llamadas selectinas.

Las selectinas consisten en una familia de proteínas que son expresadas en los leucocitos (L-selectinas), plaquetas (P-selectinas) y en las células endoteliales (E-selectinas y P-selectinas). En respuesta a estímulos las células endoteliales expresan rápidamente P-selectina en su superficie, mientras que la E-selectina es expresada dentro de las 4-6 horas de la isquemia (54). En el segundo paso, los leucocitos cesan su rolido adheriéndose a la superficie endotelial a través de la unión de moléculas de adhesión CD18 (ubicadas a nivel leucocitario) con las moléculas de adhesión intracelular 1 y 2 (ICAM-1, ICAM-2) de la superficie endotelial. Las CD18, miembros de la familia de las integrinas leucocitarias, son expresadas constitutivamente en la superficie leucocitaria (55). Las ICAM-1 y 2 son miembros de la familia de inmunoglobulinas y su expresión es estimulada durante la isquemia o frente a estímulos como el TNF- α y las interleucinas (IL) (55). El último paso es la migración de los leucocitos al parénquima. Evento mediado por la interacción de las CD18 con las ICAMs, donde los mismos adheridos al endotelio pasan al parénquima a través de las células endoteliales.

Así las moléculas de adhesión, tomadas en conjunto, se convierten en un componente crítico de la respuesta inflamatoria y por ende de la evolución de la zona isquémica. Esta respuesta inflamatoria juega un importante rol en la evolución de la isquemia cerebral, donde los leucocitos tendrían un efecto deletéreo. A nivel de la microcirculación, adheridos al endotelio interfieren con el flujo sanguíneo, posteriormente ya en el parénquima liberarían sustancias que contribuyen a la progresión de la isquemia (56, 57).

Estudios con anticuerpos monoclonales que bloquean la adhesión y migración leucocitaria (anti-CD-18 o anti-ICAMs) han demostrado reducción del área isquémica. El uso de estos agentes sería más efectivo en la injuria por reperfusión, administrados dentro de las 3 horas del comienzo de la isquemia y asociados con terapéuticas trombolíticas (58).

Las citoquinas son glicoproteínas de bajo peso molecular, que actúan como mensajeros intercelulares, producidas por una gran variedad de células como macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y plaquetas, son consideradas las principales mediadoras de las respuestas inmunológicas e inflamatorias (59). Durante la isquemia se observa un aumento en la expresión tisular y liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , IL-1 en forma temprana y la IL-6 e IL-8 tardíamente. Las citoquinas tienen varias funciones durante la isquemia cerebral, por un lado, atraen los leucocitos y estimulan la síntesis de moléculas de adhesión promoviendo la respuesta inflamatoria del tejido cerebral dañado. Por otro facilitan la trombogénesis a través del incremento de los niveles PAI-1, FT, factor de activación plaquetaria (FAP) y la inhibición del t-PA y PS. También se las ha asociado con la inducción de la muerte celular programada, apoptosis (60).

CONCLUSION

A nivel cerebral, el endotelio es un importante regulador del tono vascular, de la coagulación y de la respuesta inflamatoria tisular. En condiciones normales, éste se comporta como una superficie que impide la trombosis y mantiene un tono vasodilatador a través de la producción de ON.

La disfunción de esta estructura predispone a la isquemia tisular a través de la vasoconstricción, "pro-coagulación" y "pro-inflamación".

Durante la isquemia el endotelio falla en sus funciones y su activación tiene la finalidad de restaurar el flujo sanguíneo y conservar la función del órgano.

El conocimiento de los mecanismos involucrados en la isquemia podría brindar información para el efectivo tratamiento del ACV agudo. La intervención terapéutica sobre la función endotelial permitiría favorecer la reperfusión, disminuir el daño secundario a la infiltración de leucocitos y facilitar el mantenimiento del flujo sanguíneo luego de la reperfusión.

REFERENCIAS

1. 1996 heart and stroke facts. Dallas: American Heart Association, 1995.
2. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995; 333 (24):1581-1587.
3. Gibbon G, Dzau VJ. Molecular Therapies for Vascular Diseases. *Science* 1996; 272:698-693.
4. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 (5789):373-376.
5. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Mechanism of disease: regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323 (1):27-36.
6. Faracci FM, Brian JE. Nitric oxide and the Cerebral Circulation. *Stroke* 1994; 25:692-703.
7. van Hinsbergh VWM, ed. Vascular Control of Hemostasis. *Advances in Vascular Biology* (Vadas MH, Harlan J. series eds.) Vol. I. Amsterdam: Harwood Academy Published.1996.
8. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
9. Hallenbeck JM. Inflammatory Reaction at the Blood-Endothelial Interface in Acute Stroke. *Advances in Neurology.* Vol. 71; Cellular and Molecular Mechanism of Ischemic Brain damage. Edited by Siesjo BK and Wieloch. Lippincott-Raevn Publishers.1996.
10. Celermajer D. Endothelial Dysfunction: Does it matter? Is it reversible?. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:325-333.
11. Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ* 1998; 316:1328-1329.
12. Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathology* 1988; 133:426-433.
13. Stehouver CDA, Lambert J, Donker AJM, van Hinsbergh AWM. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* 1997; 34:55-68.
14. Berliner JA, Navad M, Fogelman AM, Frank AS, Demer LL, et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, Inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488-2496.
15. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne AM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87:1468-1474.
16. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O et al. Cigarette smoking is associated with dose-related potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilatation in health young adults. *Circulation* 1993; 88:2149-2155.
17. Landin K, Tengborn L, Smith U. Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med* 1990; 227 (4):273-278.
18. Folts JD. Cigarette smoking and thrombus formation. *Am Heart J* 1988 116; 1657-1658.
19. Ozdemir O, Karaaslan Y, Ozcebe O et al. The acute effect of smoking on platelet and endothelial released reaction is suppressed in chronic smokers. *Thromb Res* 1992; 65:263-274.
20. Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of vascular smooth muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319:512-513.
21. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide released accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
22. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.
23. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man. *Lancet* 1989; 2:997-1000.
24. Harrison DG, BatesJN. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* 1993; 87: 1461-1467.
25. Iadecola C. Does nitric oxide mediate the increase in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:3913-3916.

26. Dalkara T, Yoshida T, Irikura K, Moskowitz MA. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 1994; 33 (11):1447-1452.
27. Dalkara T, Moskowitz MA. The role of nitric oxide in cerebral ischemia. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Edited by Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B. Academy Press. 1997.
28. Zhang F, Xu S, Iadecola C. Time dependence of effects nitric oxide synthase inhibition ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15 (4):595-601.
29. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*. 1997; 20:1322-139.
30. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 1995; 333:251-253
31. Kessler Paul, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase restore endothelium-dependent relaxation in proinflammatory mediator induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1746-1755.
32. Nakashima, M., J.V. Mombouli, A.A. Taylor, and P.M. Vanhoutte. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J. Clin. Invest*. 1993; 92: 2867-2871.
33. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Human Arteries *Clin. Invest*. 1997; 100: 2793-2799.
34. Yanagisawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vacular endothelium. *Nature* 1988:332:411-415.
35. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333 (6):356-363.
36. Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, Galron R, Sarova-Pinhas I, Sokolovsky M Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke* 1997; 28 (10):1951-1955.
37. Ziv I, Flemminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E, Sokolovsky M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* 1992; 23: 1014-1016.
38. Rodeheffer RJ, Leman A, Heublein DM, Burnett J. Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc* 1992; 76:719-724.
39. Bithel TC. The physiology of primary hemostasis. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9 edition. Lee R, Bithel T, Foerster J, Athens J and Lukens J. Vol 2.
40. Haring H-P, del Zoppo GJ. Thrombosis. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Edited by Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B. Academy Press. 1997.
41. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330:517-522.
42. Macko RF; Ameriso SF; Gruber A; Griffin JH; Fernandez JA et al. Impairments of the protein C system and fibrinolysis in infection-associated stroke. *Stroke*, 27 (11):2005-11 1996.
43. D'Angelo A, Landi G, Vigano' D'Angelo S, et al. Protein C in acute stroke. *Stroke* 19:579-583, 1988.
44. Zlokovic BV. Antithrombotic, procoagulant, and fibrinolytic mechanisms in cerebral circulation: implications for brain injury and protection. *Neurosurgical focus* 1997, Vol 2, number 6.
45. Griffin JH. The thrombin paradox. *Nature* 1995; 378: 337-338.
46. Clark WM. Cytoquines and reperfusion injury. *Neurology* 1997; 49 (Suppl 4); S10-S14.
47. Macko RF, Ameriso SF, Barndt R, Clough W, Weiner JM, Fisher M. Precipitants of brain infarction. Roles of preceding infection/inflammation and recent psychological stress. *Stroke* 1996; 27 (11):1999-2004.
48. Grau AJ, Bugge F, Ziegler C, Schwarz W, Meuser J et al. Association between acute cerebrovascular ischemia and chronic and recurrent infection. *Stroke* 1997; 28 (9):1724-1729.
49. Hallenbeck JM. Cytoquinas, macrophages, and leukocytes in brain ischemia. *Neurology* 1997; 49 (Suppl 4) S5-S9.
50. Hallenbeck JM, DutkaAJ, Kochanek PM, Siren A-L, Pezeshk-pour GH et al. Stroke risk factors prepare rat brain tissue for modified local Schwartzman reaction. *Stroke* 1988; 19:863-869.

51. Bhagat K, Ray M, Vallance P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovascular research* 1996; 32: 822-829.
52. Rothlein R. Overview of leukocytes adhesion. *Neurology* 1997; 49 (Suppl 4):S3-S4.
53. Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv Pharmacol* 1994; 25: 117-169.
54. Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N, Powers C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1998; 785 (2):207-214.
55. Springer TA. Adhesion receptor of the immune system. *Nature* 1990; 346:425-433.
56. del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22 (10): 1276-1283.
57. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994; 144 (1):188-199.
58. Clark WM, Zivin JA. Antileukocyte adhesion therapy: preclinical trials and combination therapy. *Neurology* 1997; 49 (Suppl 4):S32-S36.
59. Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18 (4):503-513.
60. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18 (2):180-185.