

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA INTERNA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



IDENTIFICACIÓN Y USO DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN EL ICTUS ISQUÉMICO

Autora: Teresa García Berrocoso

Director: Dr. Joan Montaner Villalonga
Médico adjunto del Servicio de Neurología
Laboratorio de Investigación Neurovascular
Institut de Recerca
Hospital Universitari Vall d'Hebron

Convocatoria: Septiembre 2010

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El Dr. Joan Montaner Villalonga, Médico Adjunto de Neurología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Coordinador del Grup de Recerca en Malalties Neurovasculars, IRVH,

HACE CONSTAR,

que el trabajo titulado IDENTIFICACIÓN Y USO DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN EL ICTUS ISQUÉMICO ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada TERESA GARCÍA BERROCOSO, estando en condiciones de poder ser presentado como trabajo de investigación de 12 créditos, dentro del programa de doctorado en Medicina Interna (curso 2009-2010), en la convocatoria de septiembre.

Barcelona, dos de septiembre de dos mil diez.

Dr. Joan Montaner Villalonga

Índice

Anexos.....	1
Índice.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Material y métodos.....	9
Materiales.....	9
Obtención de las muestras.....	10
Análisis de proteómica.....	13
Verificación mediante inmunoensayos.....	16
Resultados.....	18
Discusión.....	23
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29
Información suplementaria.....	33

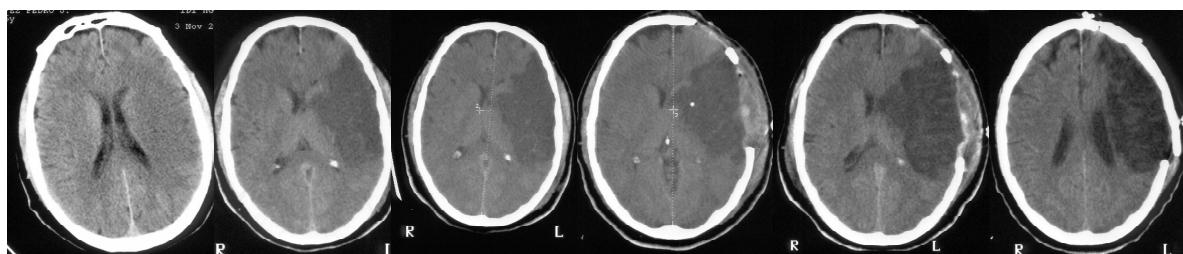
Resumen

En la actualidad no existen herramientas diagnósticas que permitan predecir el pronóstico de los pacientes de ictus isquémico. En este estudio, se analizaron muestras procedentes de microdiálisis cerebral *in vivo* de pacientes de ictus isquémico maligno para el descubrimiento de biomarcadores potenciales asociados a la enfermedad cerebrovascular. Se obtuvieron microdializados (MDs) de la zona infartada o *core* del infarto (IC), de la zona del periinfarto (PI) y de la zona contralateral no afectada (CT). Los MDs de las diferentes zonas cerebrales fueron comparados, cualitativa y cuantitativamente, mediante técnicas masivas de proteómica basadas en marcaje isobárico y espectrometría de masas. En total se identificaron 156 proteínas, de las cuales 54 presentaban una concentración elevada en las muestras de IC o PI respecto a las de CT. Complementariamente, algunos de estos candidatos se estudiaron mediante técnicas de inmunotransferencia en muestras de tejido procedente de necropsias cerebrales de pacientes fallecidos a causa de un ictus isquémico. Finalmente, en la última fase del estudio, hemos comenzado a realizar ELISAs para la determinación de estos candidatos en muestras de sangre. La proteína peroxiredoxina-1 (PRDX1) se ha determinado mediante esta técnica en sangre de pacientes de ictus y de controles sanos ($n = 28$), confirmando el valor de las muestras de MDs y de las técnicas de proteómica como fuente eficaz en el descubrimiento de nuevos marcadores sanguíneos en el ictus.

Introducción

El ictus es un trastorno neurológico secundario a una alteración en el aporte sanguíneo cerebral, siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad en los países desarrollados. El diagnóstico rápido del ictus agudo es esencial para iniciar el tratamiento adecuado, ya que algunas enfermedades no-cerebrovasculares pueden presentarse con un cuadro clínico mimetizando el ictus. Actualmente, la ausencia de una prueba simple y ampliamente disponible para la isquemia cerebral aguda sigue siendo una de las principales limitaciones en el diagnóstico (basado sobretodo en escalas clínicas y técnicas de neuroimagen) y el manejo del ictus. Además, el pronóstico de los pacientes de ictus es relevante a la hora de racionalizar el tratamiento y la necesidad de transferencia a unidades de ictus especializadas, de coste elevado.

Entre los ictus isquémicos, un 10% lo constituyen los denominados “infartos malignos” de la arteria cerebral media (ACM), que afectan a más del 50% del territorio de la ACM [1]. Su diagnóstico se basa igualmente en pruebas de neuroimagen, apareciendo edema progresivo con importante efecto de masa y desviación de la línea media. Estos ictus hemisféricos suelen tener una evolución clínica catastrófica, con un alto índice de mortalidad (~80%), superior al del resto de los ictus isquémicos a pesar de suceder frecuentemente en pacientes más jóvenes. Intentando evitar el mal pronóstico de estos pacientes, mayormente debido al deterioro neurológico precoz, se aplica un tratamiento agresivo, basado en hipotermia moderada (32-33 °C) y hemicraniectomía descompresiva [2] (Figura 1).



6 horas> 36 horas> 72 horas> Día 6> Día 36

Figura 1. Ejemplo de evolución neuroradiológica en un caso de craniectomía descompresiva (realizada a las 72 h de evolución). A día 36 se realizó la cranioplastia reconstructiva.

Debido a las limitaciones del diagnóstico radiológico, el uso de biomarcadores plasmáticos está comenzando a aplicarse en las enfermedades neurovasculares, tras su éxito en otras áreas médicas. Un biomarcador se define como un parámetro biológico, que se puede medir objetivamente, generalmente en un fluido orgánico, y que sirve como indicador de un proceso fisiológico, patológico o de respuesta farmacológica. Por tanto, los biomarcadores complementarían el proceso diagnóstico, ayudarían a tomar decisiones terapéuticas y podrían aportar valiosa información pronóstica en la práctica clínica.

Existen bastantes estudios sobre biomarcadores predictores del riesgo de padecer un ictus e incluso la FDA ha aprobado el uso de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2, del inglés) para esta aplicación [3]. Actualmente, la necesidad de biomarcadores para diagnosticar un ictus y para predecir el curso probable y el desenlace de la enfermedad es una prioridad para el equipo médico [4]. De hecho, marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva (PCR), se han asociado con recurrencia de eventos vasculares tras el ictus [5] y la isoforma de alta sensibilidad (hsPCR) predice la mortalidad tras el tratamiento fibrinolítico con el activador tisular del plasminógeno (t-PA, del inglés) [6]. Otros se han asociado a aparición de empeoramiento neurológico (como Interleucina (IL)-6 o ICAM-1 (del inglés, *Inter-cellular adhesion molecule 1*)) [7, 8].

En los pacientes afectados por un ictus isquémico y mediante la toma de imágenes por resonancia magnética y/o por tomografía computarizada por perfusión se pueden distinguir dos áreas diferentes del cerebro, conocidas como el *core* del infarto (IC) y la *penumbra*, que se corresponde anatómicamente con la zona del periinfarto (PI). La ausencia de flujo sanguíneo en el IC causa casi una completa e irreversible muerte necrótica neuronal [9]. Sin embargo, en el PI el tejido está aún parcialmente perfundido, creando un retraso en la muerte por apoptosis de las estructuras celulares de esa zona y, por tanto, siendo potencialmente salvable, bien por reperfusión rápida o por la administración de fármacos neuroprotectores. La primera opción, que emplea fármacos trombolíticos que inducen la recanalización arterial, es la única estrategia terapéutica aceptada actualmente.

Estas características particulares hacen que el estudio de estas diferentes zonas sea interesante para el descubrimiento de biomarcadores, bien para hacer un seguimiento de la evolución clínica del paciente y de su pronóstico o bien para identificar nuevas dianas terapéuticas.

La microdiálisis del cerebro humano es una técnica de obtención de muestras *in vivo* para monitorizar los cambios en la composición del fluido extracelular en el cerebro. Básicamente, se inserta en el cerebro del paciente una microsonda flexible y se perfunde una solución con una composición muy similar a la del líquido cefalorraquídeo (LCR), simulando dicha sonda la función de un vaso sanguíneo [10] (Figura 2). Las substancias endógenas, que pueden atravesar la membrana semi-permeable situada en el extremo de la sonda, difunden desde el fluido intersticial a la solución de microdiálisis. Gracias a la monitorización en tiempo real y a la toma de muestras del área vecina al tejido dañado, los microdializados (MDs) son considerados como una fuente altamente valiosa para el descubrimiento de biomarcadores cerebrales específicos.

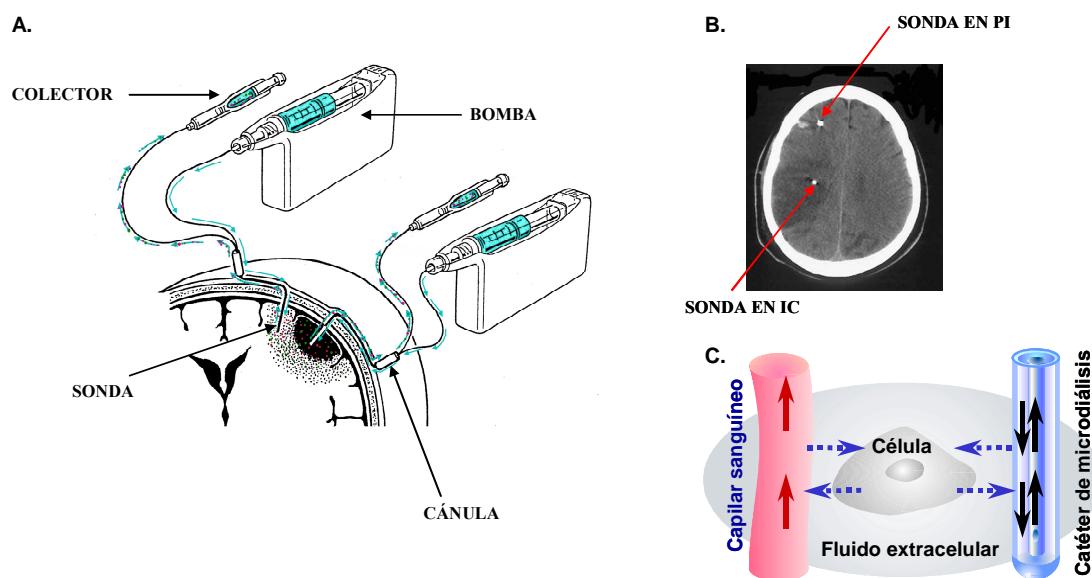


Figura 2. Microdiálisis cerebral humana. **A)** Esquema de disposición de los elementos para microdiálisis. **B)** Imagen de TAC donde se muestran los puntos de inserción de las sondas de microdiálisis. **C)** Esquema conceptual del fundamento de la microdiálisis.

En los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios donde se medían moléculas pequeñas en MDs de cerebro humano, como sustratos (p.ej. glucosa), metabolitos (p.ej. piruvato, lactato) y neurotransmisores (p.ej. glutamato) [11, 12, 13]. En cambio, pocos estudios de proteómica han sido publicados [14, 15]. El grupo de Maurer realizó un análisis proteómico de MDs de cerebro humano mediante electroforesis en gel de dos dimensiones y espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) e identificaron 27 proteínas en el hemisferio no-infartado (es decir, el contralateral (CT)) de pacientes de ictus [16]. Muchas de estas proteínas habían sido detectadas previamente en LCR, mientras sólo unas pocas parecen estar presentes exclusivamente en el fluido extracelular cerebral. En un estudio más reciente, se compararon MDs de pacientes con hemorragia subaracnoidea (HSA), con o sin vasoespasio [17]. Las proteínas Gliceraldehído-3-fosfato y Hsc-71 (del inglés *Heat-shock cognate 71 KDa*) se hallaron aumentada y disminuida, respectivamente, en el grupo que había sufrido un vasoespasio posterior a la HSA, que puede producir un infarto cerebral como efecto secundario. Los autores concluyeron que estas proteínas podrían ser utilizadas como marcadores tempranos para el desarrollo de vasoespasio sintomático tras una HSA. La búsqueda de proteínas en MDs de cerebro humano mediante proteómica es por tanto altamente relevante para determinar los cambios relacionados con una disminución de la perfusión cerebral y para descubrir nuevos marcadores sanguíneos para el diagnóstico y el pronóstico del ictus.

En este estudio se han utilizado marcadores para MS en tandem (TMTs, del inglés *Tandem Mass Tags*). Los TMTs comprenden un grupo de marcadores isobáricos aminoreactivos, sintetizados con isótopos ligeros y pesados para presentar el mismo peso total pero proporcionando iones indicadores de diferentes pesos (masas) tras la activación mediante disociación inducida por colisión (CID, del inglés *Collision-Induced Dissociation*) y subsiguiente espectrometría de masas en tandem (MS/MS) [18]. Las abundancias de los iones marcadores se usan para realizar la cuantificación relativa de los péptidos marcados con diferentes TMTs, y por lo tanto, para determinar cantidades relativas de expresión proteica.

De esta forma se pudieron comparar las muestras de los MDs cerebrales de las zonas IC, PI y CT de pacientes de ictus isquémico con “infartos malignos” de la

ACM, analizadas en este estudio. Mediante proteómica hallamos 45 proteínas cuya concentración se encontraba aumentada en los MDs de IC respecto a los de PI y CT. 27 proteínas estaban elevadas en el PI al compararlas con muestras de CT. Sorprendentemente, muchas de estas proteínas aumentaban del IC al PI y del PI al CT, reflejando en parte la extensión de la lesión cerebral. Para confirmar los resultados hallados mediante proteómica de los MDs, algunos marcadores candidatos han sido estudiados complementariamente en muestras de tejido cerebral procedente de necropsias realizadas a pacientes fallecidos a causa de ictus isquémico y/o en muestras de sangre, tanto de pacientes de ictus como de controles sanos.

Material y métodos

Materiales

La β -lactoglobulina (LACB) de leche bovina (~90%), la tripsina de páncreas porcino, la iodoacetamida (IAA, $\geq 99\%$), el hidrocloruro de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) 0,5 M y el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico se compraron a Sigma (St. Louis, Missouri, EEUU). El tampón hidrogenocarbonato de tretiamonio (TEAB) 1M pH = 8,5, el dodecilsulfato sódico (SDS, $\geq 98\%$) y el ácido trifluoroacético (TFA, $\geq 99,5\%$) se compraron a Fluka (Büchs, Suiza). La solución de hidroxilamina 50% en agua (99,999%) era de Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EEUU). El ácido hidroclorhídrico (25%) y el amonio dihidrógenofosfato ((NH_4) H_2PO_4) eran de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua para cromatografía LiChrosolv[®] y el acetonitrilo Chromasolv[®] para HPLC ($\geq 99,9\%$) eran de Merck y Sigma-Aldrich (Büchs, Suiza), respectivamente. Los TMTs Duplex (TMT²) y Sixplex (TMT⁶) fueron proveídos por Proteome Sciences (Frankfurt am Main, Alemania). Las columnas de extracción Oasis[®] HLB 1cc (10 y 30 mg) eran de Waters (Milford, Massachusetts, EEUU). ImmobilineTM DryStrips pH 3-10, 13 cm y el tampón IPG pH 3-10 eran de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). El glicerol 50% y el aceite mineral se compraron a Agilent Technologies (Wilmington, Delaware, EEUU).

Obtención de las muestras

Microdializados cerebrales humanos

Se incluyeron 6 pacientes con infartos malignos de la ACM, tratados en la Unidad de Ictus y en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neurotraumatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron siguiendo el protocolo institucional (Protocolo "CoolStroke"), que combina hipotermia moderada inducida por métodos endovasculares y hemicraniectomía descompresiva. Los criterios de inclusión en dicho protocolo son: 1) edad inferior a 65 años, 2) buena calidad de vida previa, 3) ausencia de antecedentes de otras enfermedades neurológicas o de otras patologías que reduzcan su esperanza de vida a menos de 2 años y 4) consentimiento por parte del paciente o su familiar más cercano para ser incluido en este protocolo.

La edad media de los pacientes fue de $50 \pm 9,3$ años. El hemisferio cerebral afectado por el infarto maligno de la ACM fue el izquierdo en 2 de los pacientes y el derecho en los 4 pacientes restantes. Cuatro de los pacientes incluidos en el estudio fueron mujeres.

Los pacientes fueron monitorizados con catéteres de microdiálisis cerebral de 100 KDa (catéteres CMA-71; CMA Microdialysis, Estocolmo, Suecia), que se insertaron en diferentes regiones cerebrales (CT, PI e IC). Se uso tomografía axial computerizada para confirmar la localización del catéter de microdiálisis cerebral. Los MDs se obtuvieron cada hora durante 5 días desde la perfusión con una solución artificial simulando el LCR (NaCl 147 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,2 mM y MgCl₂ 0,85 mM), gracias a microbombas CMA 106 (CMA Microdialysis).

Experimento	Core Infarto (IC)	Periinfarto (PI)	Contralateral (CT)	TMT ² 126,1	TMT ² 127,1
a	IC _a	PI _a		P _a	IC _a
b	IC _b	PI _b		IC _b	P _b
c	IC _c		CT _c	CT _c	IC _c
d	IC _d		CT _d	IC _d	CT _d
e		PI _e	CT _e	CT _e	P _e
f		PI _f	CT _f	P _f	CT _f

Tabla 1. Muestras de microdializados (MDs) cerebrales. Se indica de qué zonas se obtuvieron los MDs para hacer las comparaciones por pares en cada uno de los 6 pacientes incluidos en el estudio. Las dos últimas columnas hacen referencia a la masa/carga (*m/z*) del ión indicador utilizado en cada caso.

Las muestras se conservaron a -80 °C. Posteriormente, se realizó el análisis de proteómica en los MDs cerebrales obtenidos durante las primeras 24h de la monitorización. En la tabla 1 se resumen los datos de las diferentes muestras que se obtuvieron para cada paciente, así como los códigos experimentales usados.

Homogenados cerebrales humanos

Se incluyeron en el estudio muestras de tejido cerebral humano de 5 pacientes fallecidos (3 mujeres y 2 hombres) que habían sufrido un ictus isquémico afectando al territorio de la ACM izquierda en los 5 días previos (rango de evolución de 4 a 15 días). Los datos demográficos y clínicos se resumen en la tabla 2.

Las muestras se obtuvieron siguiendo el Protocolo de Necropsias de la Unidad de Neurología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Brevemente, durante la autopsia y mediante examen macroscópico, el área infartada es delimitada por un neuropatólogo experimentado, con apoyo de las últimas imágenes neuroradiológicas realizadas al paciente. Se recogen muestras de tejido de las zonas del IC (n = 5), PI (n = 4) y CT (n = 5). Para prevenir la degradación de las muestras, éstas se obtienen dentro de las 6 primeras horas tras el fallecimiento y se congelan de forma rápida en nitrógeno líquido, para posteriormente conservarse a -80 °C.

Paciente	Género	Edad (años)	Tiempo evolución (h)	t-PA	TH
N-I	Mujer	83	100	Sí	Sí
N-II	Hombre	67	60	Sí	No
N-III	Mujer	80	45	No	No
N-IV	Mujer	92	67	No	No
N-V	Hombre	73	15 días	No	Sí

Tabla 2. Características generales de la población estudiada (muestras de homogenados cerebrales). TH = transformación hemorrágica secundaria al ictus isquémico; t-PA = tratamiento con activador tisular del plasminógeno. El tiempo de evolución hace referencia al tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el fallecimiento del paciente.

Se prepararon los homogenados cerebrales a partir de las muestras de necropsia congeladas. Aproximadamente unos 0,2 g de tejido cerebral se homogenizaron en frío con 0,7 mL de tampón de lisis (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,6, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0,05% Brij-35, 0,02% NaN₃ y 1% Triton

X-100) complementado con inhibidores de proteasas (1 mmol/L fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés) y 7 mg/mL aprotinina), y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min. El contenido total de proteína para cada uno de los homogenados se determinó mediante el método del ácido bicinconílico (BCA; Pierce, Rockford, Illinois, EEUU).

Muestras de sangre

Las muestras de sangre de controles sanos y de pacientes de ictus se obtuvieron en el Hospital Universitario de Ginebra (HUG, Ginebra, Suiza), que colaboró en el desarrollo de este estudio. Entre octubre de 2005 y enero de 2008 los pacientes con síntomas y signos inequívocos de ictus agudo o subagudo fueron reclutados para el estudio. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: (1) tiempo del inicio del ictus superior a 3 días o tras un ictus previo en los 3 meses precedentes; (2) hemorragia extra-cerebral o traumatismo, como HSA, hematoma subdural o daño cerebral traumático (TBI, del inglés *Traumatic Brain Injury*); (3) la presencia de otras patologías potencialmente confusoras como cáncer, fallo renal o hepático, infarto de miocardio o enfermedades psiquiátricas. Cada paciente incluido en el estudio siguió un protocolo estandarizado de evaluación clínica y neuroradiológica y las intervenciones terapéuticas fueron supervisadas por neurólogos cualificados del Departamento de Neurología del HUG.

Los controles sanos fueron definidos como familiares de los pacientes o pacientes afectados de varios tipos de enfermedades médicas o quirúrgicas a excepción de enfermedades neurológicas cerebrovasculares. Además, se requería que no tuvieran antecedentes de ictus o enfermedades cerebrovasculares o trombóticas.

Brevemente, las muestras de sangre fueron extraídas en tubos de recolección de tapón rojo (tubos con partículas de sílice para activar la formación del coágulo; de 6 mL, 13 x 100 mm, de BD Vacutainers, Plymouth, Reino Unido) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 45 min para la formación del coágulo. No se utilizó ningún aditivo (anti-coagulante, inhibidor de proteasas o conservador). Al finalizar el tiempo de coagulación, se centrifugaron las muestras (1.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente) para descartar el precipitado o *pellet* celular. Inmediatamente después, cada muestra de suero

fue alicuotada y conservada a -80 °C hasta su uso. Para este estudio, entre todos los participantes se seleccionaron al azar 14 controles sanos y 14 pacientes de ictus, emparejados por edad y género. En la tabla 3 se resumen las características de los pacientes de ictus y de los controles sanos.

	Controles	Ictus
n	14	14
Edad (años)	69,3 ± 14,5	69,5 ± 15,6
Género masculino (n (%))	9 (64,3)	9 (64,3)
Tiempo inicio de síntomas (min)		486,1 ± 542,8

Tabla 3. Características generales de la población estudiada (muestras de sangre).

Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvieron consentimientos informados de los pacientes (o sus familiares) de acuerdo con la declaración de Helsinki, para todos los tipos de muestras obtenidas.

Análisis de proteómica

Preparación de las muestras

10 µL de MDs cerebrales se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de una dimensión (1-D) (SDS-PAGE, 15%). Los geles se tiñeron con nitrato de plata y las imágenes se analizaron con el programa ImageQuant TL (GE Healthcare). La señal de cada carril fue integrada y cuantificada relativamente con respecto a señales de otros carriles del mismo gel.

Se usaron volúmenes apropiados de MDs según los análisis de los 1-D SDS-PAGE para comparar idéntica cantidad de proteína en cada experimento cuantitativo (Experimento a-f en la Tabla 1). Se añadió LACB en la misma cantidad en cada par de muestras, a dilución 1/50 respecto a la cantidad de proteína. Las 6 x 2 muestras fueron secadas por vacío.

Las muestras de MDs se disolvieron en 100 µL de TEAB 100 mM pH = 8. Para la reducción de las muestras, se añadieron 1 µL de SDS 1% y 2 µL de TCEP 50 mM y se mantuvieron a 60 °C durante 1h. Tras la reducción, se procesaron mediante alquilación con IAA (1 µL de IAA 400 mM, durante 30 min, en oscuridad) y se digirieron con tripsina (10 µL tripsina 0,2 µg/µL en TEAB, incubación o/n a 37 °C).

El marcaje con TMT se realizó durante 1h, tras la adición de 40,3 μ L de reactivo TMT² en CH₃CN (0,83 mg, $2,42 \times 10^{-6}$ mol). Los marcadores se usaron tal como se describe en la Tabla 1. Se añadieron 8 μ L de hidroxilamina 5% durante 15 min. Las muestras diferencialmente marcadas con los TMT² se juntaron todas en un mismo tubo y se secaron. El marcaje con TMT⁶ se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo.

Se eliminaron las sales de las muestras mediante las columnas de extracción Oasis[®] HLB 1 cc (30 mg). Tras el secado de las muestras, éstas se disolvieron en 1616,4 μ L de agua, 172,8 μ L de glicerol 50% y 10,8 μ L de tampón IPG pH 3-10. Las tiras IPG (pH 3-10, 13 cm) se rehidrataron durante 30 min con una solución de 89,8% de agua, 9,6% de glicerol 50% y 0,6% de anfolitos. Las muestras se cargaron en el *off-gel* de 12 pocillos para llevar a cabo el fraccionamiento de las muestras (de tipo *isoelectric focusing fractionation*) (Figura 3). Se utilizó un 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies), limitando la corriente a 50 μ A y con un límite de 20 kV·h antes de llegar al voltaje de 500 V. Las fracciones se recolectaron y se midió su pH. Inmediatamente, las fracciones *off-gel* fueron secadas, lavadas con las columnas de extracción Oasis[®] HLB 1cc (10 mg) y secadas de nuevo.

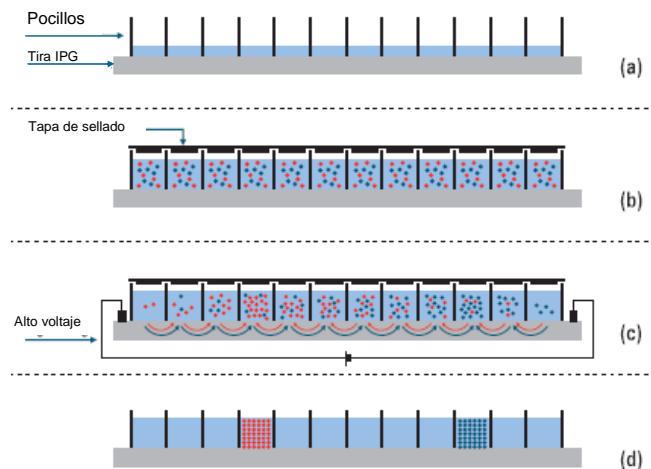


Figura 3. Fraccionamiento isoelectrónico de las muestras marcadas de MDs. **A)** Acoplamiento de la tira IPG con la estructura de pocillos. **B)** Distribución de la muestra diluida en los pocillos. **C)** Aplicación de voltaje para la separación de la muestra según su pI. **D)** Obtención de las fracciones.

Espectrometría de masas (MS)

Se realizó MS de tipo MALDI-TOF/TOF (del inglés, *Matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight*) en un 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Las fracciones *off-gel* se separaron mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC, del inglés)

utilizando un sistema Alliance (Waters) equipado con *flow splitter*. Se utilizó una columna 5 μm 200 \AA Magic C18 AQ 0,1 x 100 mm y la separación se llevó a cabo durante 60 min usando un gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 97%/3%/0,1% (solvente A) y $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 5%/95%/0,1% (solvente B). El gradiente se realizó de la siguiente manera: 0-10 min 98% A y 2% B, luego 90% A y 10% B a los 12 min, 50% A y 50% B a los 55 min y 98% B a los 60 min a un flujo estimado de 400 nL/min.

Las fracciones de un minuto se depositaron en placas MALDI, así como la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 50%/50%/0,1% con 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Todos los espectros de masa fueron adquiridos en modo de ionización positiva con un rango de masa/carga (*m/z*) de 800 a 4.000 (1.000 disparos con intensidad láser de 4.000 a.u.). Tras la selección de los 20 precursores más intensos en el máximo, los experimentos MS/MS (1.500 disparos con intensidad láser de 4.500 a.u.) se realizaron a energía de colisión media.

Identificación de proteínas y cuantificación relativa

Las listas de picos fueron generadas usando el programa 4000 Series Explorer (Applied Biosystems). Para cada muestra, los archivos *mgf* resultantes del análisis de las 12 fracciones *off-gel* fueron combinados y se realizó la búsqueda en la base de datos UniProt-Swiss-Prot/TrEMBL, utilizando el programa Phenyx (GeneBio, Ginebra, Suiza).

Para la búsqueda en la base de datos se especificó la taxonomía *Homo sapiens* (93.005 entradas de proteínas) (por otro lado también se buscó para *Bos taurus* (17.268 entradas de proteínas) para buscar la LACB adicionada). Se realizó una única ronda de búsqueda, seleccionando el *p*-valor máximo como 10^{-6} . Las puntuaciones o scores de los péptidos se fijaron para controlar la tasa de descubrimiento de péptidos falsos (FDR, del inglés) por debajo del 1% (scores de 7,0 a 7,5).

Las áreas de los iones indicadores de los péptidos emparejados con proteínas se obtuvieron de los espectros de MS/MS usando la herramienta de análisis del programa 4000 Series Explorer. La cuantificación se realizó solamente con péptidos que eran únicos a una proteína; al menos dos péptidos con diferente secuencia se requerían para cuantificar una proteína. El procesamiento de los

datos fue efectuado según lo previamente descrito [18]. Brevemente, se realizó corrección isotópica y normalización con la LACB estándar añadida. Para cada péptido, la abundancia relativa de cada ión indicador se calculó como el ratio de la abundancia de dicho ión y la suma de las abundancias de todos los iones indicadores. A partir de esto, los ratios para las proteínas fueron calculados como los ratios de las medias aritméticas de las abundancias relativas de los péptidos (correspondientes a cada canal del ión indicador), en concordancia con el programa Libra (incluido en el modulo de herramientas para análisis proteómico *Trans-Proteomic Pipeline*).

El control de calidad de los datos cuantitativos se realizó mediante la proteína LACB estándar. Un último paso de normalización fue realizado para solapar las áreas comunes entre las distribuciones de frecuencia de las abundancias relativas para ambos grupos marcados con TMT².

Los puntos de corte cuantitativos, que reflejaban incremento o disminución significativa de proteínas usando la tecnología de las TMT² isobáricas, fueron evaluados experimentalmente aplicando el anterior protocolo proteómico completo a los mismos MDs. En este análisis, se usaron los indicadores TMT⁶ para marcar 2 muestras idénticas de MDs de IC, PI y CT. Al no esperar diferencias entre las mismas muestras (p.ej. los duplicados de IC), las desviaciones de ratio 1:1 se consideraron como falsos positivos. Como resultado, 1% de falsos positivos fue hallado para ratios de puntos de corte de 1,68 y 0,59. Finalmente, se escogieron valores de punto de corte de 0,5 y 2,0. Estos valores realmente se corresponden con un mayor intervalo en relación a los puntos de corte hallados experimentalmente, disminuyendo aún más el riesgo de encontrar falsos positivos.

Verificación mediante inmunoensayos

Western Blotting

Se seleccionaron 7 candidatos para el estudio de verificación: MBP (del inglés *myelin basic protein*), CysC (*Cystatin-C*), PRDX1, PRDX2, ACBP (*Acyl-coA-binding protein*), CSRP1 (*Cysteine and glycine-rich protein 1*) y PEBP1 (*Phosphatidylethanolamine-binding protein 1*). Brevemente, se cargó idéntica cantidad de proteína de homogenado cerebral de las diferentes zonas (ajustada para cada candidato, entre 8 – 20 µg) en tampón Laemmli (Bio-rad

Laboratorios Inc., Hercules, California, EEUU) suplementado con 10% de Ditioltreitol (DTT; Sigma-Aldrich) 50 mM y se separaron mediante SDS-PAGE de 14 o 17% (según el peso molecular del candidato) a 100 V. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EEUU) utilizando el sistema Transblot cell (Bio-rad) durante 45 min-1 h a 100 V. El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó con leche desnatada en polvo al 10% en PBS-Tween 0,05% (TPBS), previamente a la incubación de las membranas con el anticuerpo primario correspondiente, *o/n* a 4 °C (en algún caso, la incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo de rata anti-MBP humana (1:5.000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anticuerpo de conejo anti-CysC humana (1:10.000, DAKO, Glostrup, Dinamarca), anticuerpos de conejo anti-PRDX1 y 2 humanas (1:10.000, Abfrontier, Seúl, Corea), anticuerpo de ratón anti-ACBP humana (1:500, Abcam), anticuerpo de conejo anti-CSRP1 humana (1:3.000, Abcam) y anticuerpo de conejo anti-PEBP1 humana (1:10.000, Chemicon, Billerica, Massachusetts, EEUU). Los anticuerpos secundarios-HRP correspondientes (1:2.000 – 1:20.000, Chemicon) se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Antes y después de las incubaciones, las membranas se lavaron 3 veces (10 min cada una) con TPBS. La inmunodetección de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 1:2.500, Ambion, Austin, Texas, EEUU) o β-actina (1:10.000, Sigma-Aldrich) sirvió como control de carga de las muestras de homogenado. Se utilizó el sistema de detección para Western blotting ECL plus (GE Healthcare) y las membranas se visualizaron con un analizador de quimioluminiscencia (LAS-3000, Fujifilm, EEUU). La cuantificación por densitometría de las bandas se realizó con el programa Quantity One (Bio-rad) y los resultados para cada uno de los candidatos se normalizaron respecto a los del control de carga utilizado. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el programa SPSS (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas al 95% del intervalo de confianza para los p-valores < 0,05.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Complementariamente, PRDX1 se analizó en suero usando un kit comercial de ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Alemania), siguiéndose las indicaciones del fabricante.

El análisis estadístico y el gráfico fue realizado usando el programa GraphPad Prism (versión 4.03, GraphPad software Inc., San Diego, California, EEUU).

Resultados

Los MDs cerebrales humanos fueron analizados por pares de regiones cerebrales de 6 pacientes de ictus. Se realizaron 6 comparaciones proteómicas cuantitativas en los Experimentos a-f usando marcaje isobárico (TMT², con iones indicadores en $m/z = 126,1$ y $127,1$) (Tabla 1), separación multidimensional y detección por MS/MS.

Proteína	Abreviación	Ratio IC/PI (Exp _a)	Ratio IC/PI (Exp _b)
Acyl-CoA-binding protein	ACBP	1,95	2,67
Beta-2-microglobulin precursor	B2MG	1,49	2,09
Coactosin-like protein	COTL1	1,72	2,04
Complement C4-A precursor	P0COL4	2,50	1,10
Cystatin-B	CYTB		2,68
Cystatin-C	CYSC	1,73	1,86
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	3,33	2,88
Fatty acid-binding protein, brain	FABPB	2,65	
Fibrinogen alpha chain precursor	FIBA	2,97	0,61
Glutathione S-transferase P	GSTP1	2,79	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	HNRPG	2,35	
Metallothionein-3	MT3	2,10	2,79
Myelin basic protein [ISOFORM 3 or 4]	MBP	1,71	3,11
Neutrophil defensin 1 precursor	DEF1		2,45
Paralemmin	PALM	3,52	
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	2,45	1,60
Peroxiredoxin-1	PRDX1		1,93
Peroxiredoxin-2	PRDX2	2,72	
Peroxiredoxin-6	PRDX6	2,15	2,16
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	2,06	1,60
Plasma retinol-binding protein precursor	RETBP	2,83	1,63
Plasminogen precursor	PLMN	2,27	
Platelet basic protein precursor	SCYB7	2,51	0,85
Profilin-1	PROF1	2,40	0,91
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3L1	2,17	1,92
Thioredoxin	THIO	2,17	
Ubiquitin	UBIQ	2,09	1,50

Tabla 4. Ratios IC/PI aumentados en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes; en negrita, proteínas que se hallaron significativamente incrementadas en ambos pacientes.

Gracias a estos análisis de proteómica, se identificaron un total de 156 proteínas diferentes con 939 péptidos únicos. En concreto, se identificaron 108 proteínas en los MDs del IC, 137 en los del PI y 134 en los del CT.

Las 6 comparaciones dieron 93 proteínas, tanto incrementadas (ratios > 2,0; 54 proteínas) como disminuidas (ratios < 0,5; 39 proteínas) al comparar pares de MDs. En una primera aproximación, hemos profundizado más en el estudio de aquellas proteínas que se encontraban aumentadas en el IC y/o el PI respecto al CT, ya que nuestro objetivo era descubrir biomarcadores que puedan asesorarnos sobre la evolución del daño cerebral en los pacientes de ictus. Por ello, las proteínas con ratios inferiores a 0,5 se presentan como información suplementaria (Tablas S1-S3).

En resumen, 27 proteínas aumentaban en las muestras de IC respecto a las de PI, 24 proteínas aumentaban en las muestras de IC respecto a las de CT y 27 proteínas aumentaban en las muestras de PI respecto a las de CT (Tablas 4-6).

Proteína	Abreviación	Ratio IC/CT (Exp _c)	Ratio IC/CT (Exp _d)
Acyl-CoA-binding protein	ACBP	12,53	
Apolipoprotein A-II precursor	APOA2		2,28
Apolipoprotein A-IV precursor	APOA4		3,79
Carbonic anhydrase 1	CAH1	0,29	4,68
Carbonic anhydrase 2	CAH2		3,18
Chitinase-3-like protein 1 precursor	CH3L1	2,44	
Cofilin-1	COF1		2,00
Cystatin-B	CYTB		2,10
Fibrinogen alpha chain precursor	FIBA	0,46	2,33
Flavin reductase	BLVRB		2,22
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	4,13	0,37
Hemoglobin subunit alpha	HBA		3,21
Histone H1.2	H12		2,97
Histone H1.5	H15		2,03
Lysozyme C precursor	LYSC		2,75
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1	6,31	
Neurofilament medium polypeptide	NFM	4,68	
Neutrophil defensin 1 precursor	DEF1		4,23
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	8,25	1,69
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	4,88	
Thymosin beta-10	TYB10	4,16	
Thymosin beta-4	TYB4	2,39	
Triosephosphate isomerase	TPIS	3,50	
Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3		2,04

Tabla 5. Ratios IC/CT aumentados en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes.

Entre las proteínas que aumentaban en IC y/o PI respecto a CT se incluyen las elegidas como candidatos para la verificación de los resultados. Algunas se han asociado previamente con el ictus u otras patologías cerebrales o de riesgo para la enfermedad isquémica, como la MBP [19, 20] o la CysC [21]. También está aumentada la familia de las peroxirredoxinas (PRDXs), involucradas en los mecanismos de regulación redox de varias células del sistema nervioso y por tanto contribuyendo a la patología cerebral. Tanto las PRDXs como ACBP, CSRP1 o PEBP1 no han sido estudiadas previamente en el ámbito del ictus, siendo de gran interés como nuevos biomarcadores.

Proteína	Abreviación	Ratio PI/CT (Exp _e)	Ratio PI/CT (Exp _f)
Aquaporin-4	AQP4		2,00
Coactosin-like protein	COTL1		2,64
Cystatin-B	CYTB	2,16	1,81
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1		4,58
Diazepam binding inhibitor, splice form 1c	Q4VWZ6		2,21
Fibrinogen alpha chain precursor	FIBA	2,98	1,05
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	0,31	2,33
Hydroxyacylglycerol hydrolase	GLO2		2,64
Kininogen-1 precursor	KNG1	3,97	
Lysozyme C precursor	LYSC	2,21	
Metallothionein-2	MT2	6,02	4,73
Metallothionein-3	MT3		4,57
Myoglobin	MYG	3,09	
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1		2,21
Neurofilament medium polypeptide	NFM		2,62
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA		3,28
Peroxiredoxin-1	PRDX1		1,24
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1		3,35
Plasminogen precursor	PLMN	2,52	
Platelet basic protein precursor	SCYB7	3,13	
Profilin-1	PROF1	3,81	
Prothrombin precursor	THR2	2,64	
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3L1		2,77
Spectrin beta chain, brain 1	SPTB2		2,25
Stathmin	STMN1		2,15
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1		2,06
Ubiquitin	UBIQ	2,16	2,76

Tabla 6. Ratios PI/CT aumentados en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes; en negrita, proteínas que se hallaron significativamente incrementadas en ambos pacientes.

En la Figura 4 se muestra la evolución de los niveles de proteína observada para los MDs de algunas proteínas de las cuales se obtuvieron resultados en las 3 zonas de estudio. La mayoría de estas proteínas aumentan sus niveles en los MDs de CT a PI y de PI a IC.

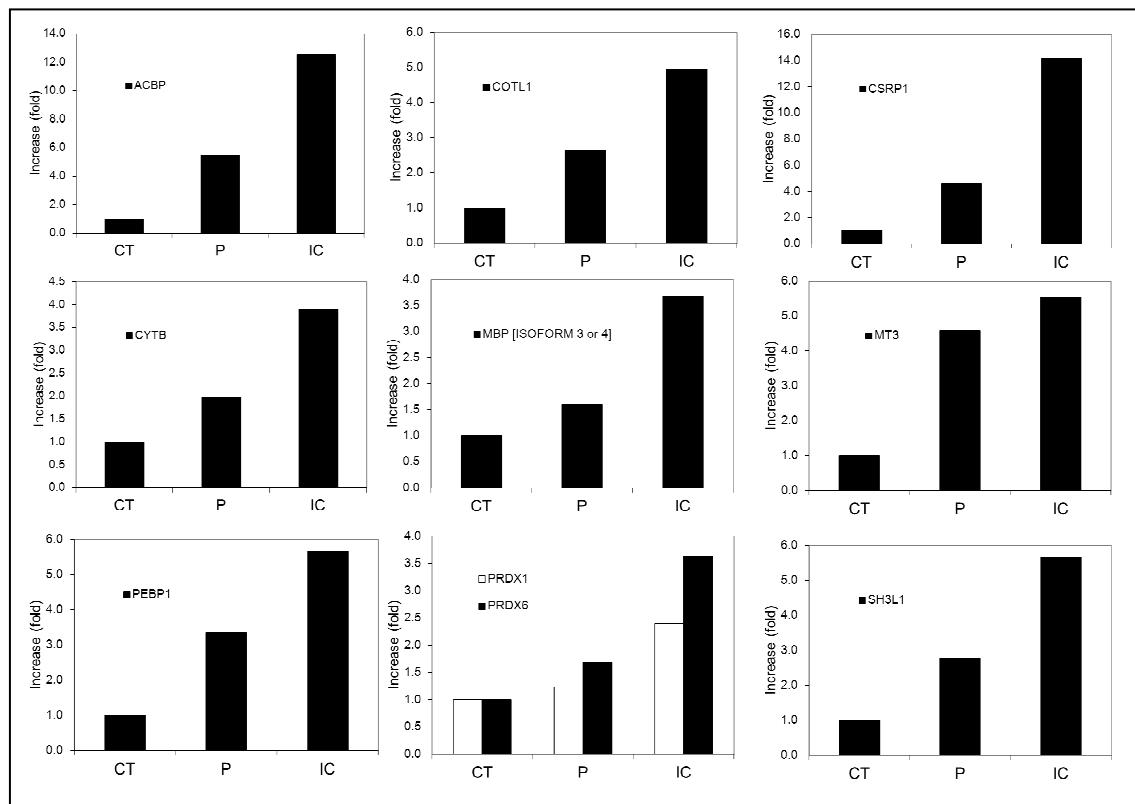


Figura 4. Progresión de los niveles de varias proteínas en los MDs de las diferentes zonas estudiadas. CT = contralateral, P = preinfarto, IC = core del infarto.

Complementariamente, se realizaron experimentos de inmunotransferencia o *Western blotting* para confirmar los resultados obtenidos. Sorprendentemente, al cuantificar las proteínas candidatas en los homogenados cerebrales humanos, en algunos casos los resultados fueron opuestos a los hallados para los MDs mediante MS/MS, observándose menor concentración en la zona infartada que en el contralateral (p.ej. para CysC ($p = 0,059$) y ACBP ($p = 0,079$)) y en otros casos no se hallaron diferencias entre las zonas cerebrales (p.ej. para PRDX1 ($p = 0,309$), CSRP1 ($p = 0,944$), PRDX2 ($p = 1,000$) y PEBP1 ($p = 0,500$)). Para la MBP se confirmaron los resultados ($p = 0,083$), siendo mayor su concentración en la zona del IC que en la zona CT en las muestras de homogenados cerebrales (Figura 5).

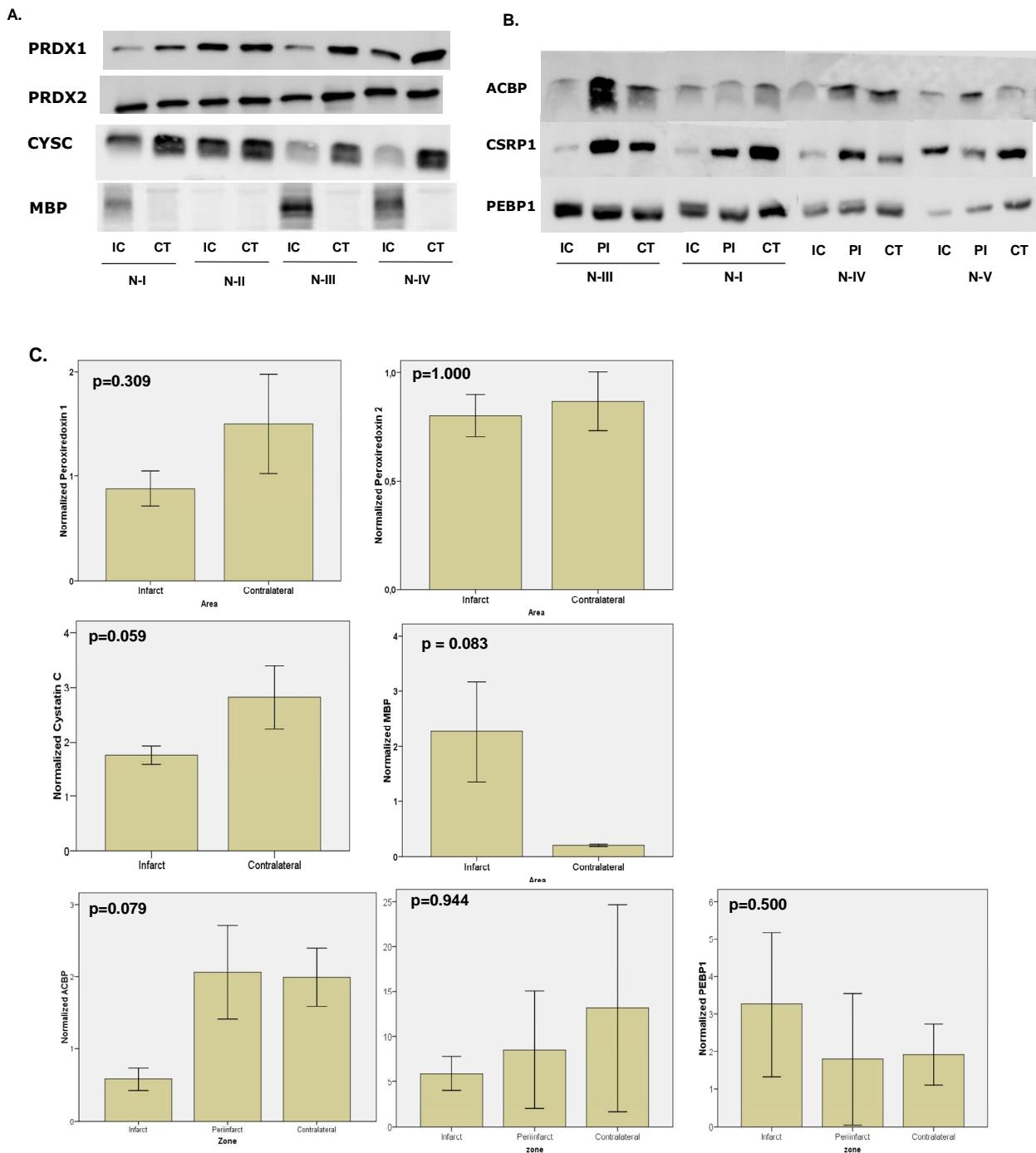


Figura 5. Western blot de las proteínas candidatas. **A.** Representación de Western blot realizados con homogenados cerebrales comparando IC y CT. **B.** Representación de Western blot comparando las 3 zonas de estudio (IC, PI, CT). **C.** Gráficas cuantitativas de los resultados de Western blot, para cada una de las proteínas candidatas, normalizadas por el control de carga de cada membrana (GAPDH o β -actina). N = paciente.

Por otro lado, se realizó ELISA para PRDX1 en suero de controles sanos ($n = 14$) y de pacientes de ictus ($n = 14$). Los valores medios obtenidos para PRDX1 en los controles fue de $7,3 \pm 12,7 \mu\text{g/L}$ y en los pacientes de ictus fue de $145,7 \pm 144 \mu\text{g/L}$ ($p = 0,0001$) (Figura 6). Por tanto, en la sangre de los pacientes de ictus existe unas 20 veces más PRDX1 que en la sangre de individuos sanos, siendo esta diferencia 10 veces mayor a la hallada en los MDs cerebrales.

Estos resultados muestran la utilidad de los MDs cerebrales para el descubrimiento de nuevos biomarcadores sanguíneos para el ictus. Otros candidatos están a la espera de ser analizados en muestras de sangre.

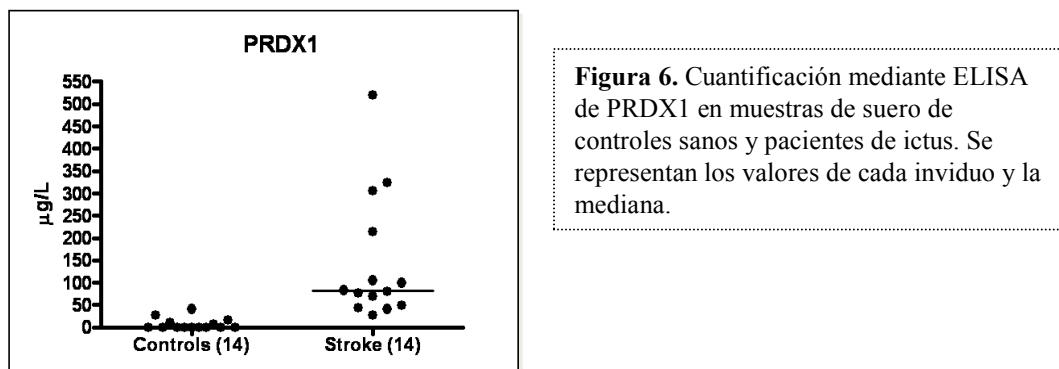


Figura 6. Cuantificación mediante ELISA de PRDX1 en muestras de suero de controles sanos y pacientes de ictus. Se representan los valores de cada individuo y la mediana.

Discusión

El objetivo de este estudio era el descubrimiento de proteínas que puedan ser empleadas como marcadores del ictus mediante comparaciones de los MDs de IC, PI y CT de pacientes de ictus isquémico. Los MDs cerebrales humanos fueron analizados usando tecnología proteómica con análisis por MS, buscando niveles de proteína aumentados en los MDs de las regiones afectadas. Para un número sustancial de proteínas fue posible determinar su nivel de progresión desde CT a PI y a IC en las muestras de MDs (algunas de ellas representadas en la Figura 4). Al intentar confirmar estos resultados en el tejido cerebral, mediante el análisis de homogenados por Western blotting, en algunos casos hallamos la condición opuesta: la concentración de proteína era mayor en la zona del CT que en IC y/o PI. Actualmente desconocemos el porqué de estos resultados opuestos. Una posible hipótesis sería que las

células dañadas tras el evento isquémico liberen su contenido al espacio extracelular, recuperándose por tanto en las muestras de MDs y dejando las muestras de tejido “vacías” de estas proteínas. Nos disponemos a realizar nuevos tipos de experimentos para intentar comprender esta variación (p.ej. mediante experimentos de microdialisis in vivo en modelos animales de isquemia cerebral).

Los niveles aumentados en IC respecto a CT en las muestras de MDs para la MBP sí han sido confirmados en las muestras de homogenados cerebrales (Figura 5). La función principal de la MBP es la de formar y estabilizar la membrana de la mielina, en la sustancia blanca del cerebro. Quizás el hecho de que las sondas de microdialisis se coloquen en una zona profunda del cerebro (formada principalmente por sustancia blanca) puede haber contribuido a que en el caso de la MBP, los resultados de inmunotransferencia sigan la misma dirección. De hecho, se ha estudiado el papel de MBP como marcador de localización del infarto en pacientes de ictus isquémico, siendo más elevados los niveles de MBP en los pacientes con infartos subcorticales [22]. En todo caso, más experimentos serán necesarios para comprender estos mecanismos (de nuevo mediante modelos animales o analizando en mayor profundidad otras proteínas típicamente de la sustancia blanca, que también fueron halladas en los experimentos de MS/MS, como la GFAP o *Glial fibrillary acidic protein*).

Un aspecto a considerar en este tipo de comparaciones es la diferencia temporal entre la recogida de las muestras de MDs y la de las muestras de tejido cerebral. En el primer caso, los MDs se obtienen en una fase muy temprana del ictus; en cambio, las muestras de tejido se obtienen tras el fallecimiento del paciente, normalmente tras varios días de evolución de la enfermedad. Por tanto, el hecho de que los resultados sean opuestos quizás nos está indicando que existe un diferente *molecular timing* a lo largo de la evolución del paciente de ictus. Aunque no en tejido, existen trabajos experimentales que observan diferencias en el tiempo para los niveles de biomarcadores de ictus entre LCR y suero en modelos animales [23].

En el caso de la PRDX1, para la cual realizamos ELISA de muestras de suero de controles sanos y pacientes de ictus, sí hemos podido confirmar su uso

como biomarcador para esta patología (Figura 6), aunque la validación de los resultados en una nueva cohorte y con una mayor n muestral es necesaria. Para las otras PRDXs actualmente no existen ELISAs comerciales para realizar el análisis, aunque son buenos biomarcadores candidatos. Las PRDXs son enzimas antioxidantes ubicuos involucrados en la degradación de peróxidos de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno, que también se generan en la patología del ictus [24]. Estas proteínas antioxidantes tiol-específicas también se conocen como tiorredoxinas peroxidasa. La familia de las PRDXs está compuesta por 6 grupos diferentes que pueden clasificarse en 2 categorías, las PRDXs 1-Cys y las 2-Cys, según el número de residuos de cisteína involucrados en el proceso de reducción. La PRDX6 es el único miembro de las 1-Cys. En el cerebro, PRDX1 y PRDX6 parecen ser fundamentalmente expresadas por los astrocitos mientras la PRDX2 se expresa exclusivamente en neuronas [25, 26]. La PRDX2 está elevada en las *substantia nigra* de pacientes de la enfermedad de Parkinson [27] y en el córtex frontal y el cerebelo de pacientes con síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Pick [28]. Se ha demostrado que PRDX1 forma parte de una respuesta adaptativa al estrés oxidativo en las células endoteliales cerebrales y que tiene efectos protectores en la barrera hematoencefálica dañada [29]. En este estudio, los niveles elevados de PRDX1 en los MDs de las áreas dañadas del cerebro y en la sangre de los pacientes de ictus parecen ser altamente relevantes para futuras investigaciones en las enfermedades cerebrovasculares. Es interesante que PRDX1 está implicada en mecanismos redox protectores similares a GSTP1 (*Glutation S-transferase P1*), ya que GSTP1 también se halla elevada en la sangre de pacientes de ictus en las 3 primeras horas tras el inicio de los síntomas y sus niveles correlacionan con la severidad del ictus, el pronóstico funcional y la mortalidad al tercer mes [30, 31]. Además, existen evidencias de que PRDX1 y GSTP1 interaccionan [32] y de que GSTP1 reactiva la PRDX6 oxidada mediante la formación de un complejo [33].

Los pacientes con un infarto maligno de la ACM, como los incluidos en nuestro estudio, son pacientes con un enorme daño cerebral que reciben varios tratamientos en las unidades de ictus, como hipotermia moderada, que podría

modificar los patrones de expresión de algunas de las proteínas descritas. Otra limitación de nuestro estudio es que las tasas de recuperación mediante las sondas de microdiálisis de 100 KDa, así como su estabilidad a lo largo del tiempo, son desconocidas para la mayoría de las proteínas halladas. Ambos factores deben ser tenidos en cuenta y deberían analizarse en futuros estudios. Los análisis con 1-D SDS-PAGE de los diferentes MDs en estudio mostraron patrones ligeramente diferentes así como grandes variaciones en la concentración proteica total entre las muestras, aunque éstas fueron consideradas en la preparación de las muestras para MS/MS. Algunas de estas variaciones pueden posiblemente ser resultado de las alteraciones en la recuperación a través de la membrana de microdiálisis además de las variaciones biológicas y de la gravedad del ictus. En un estudio previo con MDs del CT de pacientes de ictus, la concentración proteica de 18 muestras fue determinada entre 0,083 y 0,395 g/L con una media de $0,21 \pm 0,11$ g/L [16]. En otro trabajo previo [34], la concentración de proteína resultó variar considerablemente de una muestra a otra en los MDs de CT, mientras las concentraciones de moléculas pequeñas eran uniformes en el CT pero más heterogéneas en el IC. Por tanto, esperaríamos una gran variación en la concentración proteica en las muestras de IC, así como en las de PI.

La recolección de las muestras y el análisis proteómico influyeron en la exactitud y la precisión de los datos cuantitativos. Los cambios de proteína se consideraron significativos para los puntos de corte de los ratios por debajo de 0,5 y por encima de 2 (por debajo y por encima, respectivamente, de los puntos de corte determinados experimentalmente). De hecho, las mayores diferencias o las variaciones consistentes en varios experimentos aseguraron la alta confianza de estos puntos de corte. Las pocas inconsistencias en los cambios proteicos podrían ser resultado de factores incontrolados que deberían analizarse en futuros trabajos. Con un peso molecular de 95 KDa, FIBA (del inglés *Fibrinogen alpha chain precursor*) (Tablas 4-6) podría haberse recolectado ineficientemente a través de la membrana de diálisis. Además, GFAP (50 KDa) (Tablas 5 y 6) puede dimerizar y oligomerizar, así como copolimerizar con otras proteínas [35], y su recolección total podría haber sido alterada.

Hasta el momento, éste es el mayor estudio de proteómica en MDs de cerebro humano, y el primero en focalizar en la isquemia cerebral. Hemos identificado un total de 156 proteínas, de las cuales 17 (de 27) habían sido previamente halladas por Maurer y sus colaboradores en MDs cerebrales [16]. El propósito de este estudio fue obtener un mapa cuantitativo de los MDs cerebrales humanos, así como una monitorización del fluido extracelular en el cerebro de los pacientes de ictus. Dependiendo de la región sondeada con la microdiálisis, esperábamos obtener marcadores proteicos relevantes para el ictus.

Muchas de las proteínas halladas habían sido previamente identificadas en el LCR [18, 36, 37]. En concreto, varias proteínas con concentraciones incrementadas entre los pares (Tablas 4-6) habían sido previamente identificadas en un estudio comparativo entre LCR *ante- y post-mortem* [18]. Por ejemplo, este es el caso de la cistatina-B, GFAP, S100B, PRDX1 y PRDX2. En este estudio previo, PRDX1 y PRDX2 se encontraban aumentadas con un ratio de 14,74 y 8,25, respectivamente en LCR *post-mortem* comparado con LCR *ante-mortem*. La correlación de muchos de los resultados cuantitativos entre ambos estudios no sólo valida el uso de LCR *post-mortem* como modelo de daño cerebral masivo, sino también subraya el valor del mapa proteómico cuantitativo obtenido con los MDs.

En la mayoría de los casos, la progresión/incremento de los niveles de proteína desde el CT al IC, tal y como se presenta en la Figura 4, refleja una relación directa con la gravedad del daño cerebral. Estos resultados muestran una tendencia biológica relevante que refuerza la verosimilitud de este estudio, ya que si no existe perfusión, la región del IC se expande hacia el PI. Los cambios de proteínas identificados entre los MDs de PI e IC reflejan las respuestas celulares a la isquemia, como la síntesis de proteínas de estrés. Las diferencias en los niveles de proteína del fluido extracelular de ambas regiones cerebrales podrían ayudar en la investigación en el campo de la neuroprotección y de los mecanismos apoptóticos y en desarrollar estrategias para prevenir la muerte isquémica celular. Curiosamente, muchas de las proteínas halladas disminuidas en IC vs. PI, IC vs. CT y PI vs. CT (Información suplementaria S1-S3) eran proteínas sanguíneas (albúmina sérica, serotransferrina, haptoglobina, hemoglobinas), reflejando de alguna manera la variación regional del flujo sanguíneo alterado en las diferentes áreas cerebrales.

Conclusiones

Este estudio explora los MDs cerebrales de pacientes de ictus mediante análisis proteómico. Los resultados cualitativos ofrecen un mapa extenso del proteoma de MDs y del fluido extracelular del cerebro humano. Además, las comparaciones cuantitativas de los MDs de varias áreas del cerebro humano isquémico proporcionan biomarcadores potenciales para las enfermedades cerebrovasculares. El estudio de algunos de estos candidatos en muestras de tejido cerebral genera nuevas dudas en el ámbito de los procesos moleculares que ocurren el ictus y promueve la necesidad de nuevos experimentos para su comprensión.

En una primera fase de validación, alguna de las proteínas halladas aumentadas en los MDs de las zonas dañadas mediante análisis proteómico ha sido verificada en muestras de sangre de una pequeña cohorte de pacientes de ictus. La correlación entre los datos de descubrimiento y la validación demuestran que muchas de las proteínas halladas podrían ser de interés para el diagnóstico y el pronóstico del ictus, así como para otros trastornos de daño cerebral relacionados. Se han demostrado diferencias claras en los niveles de proteína del fluido extracelular del PI y del IC asociadas a daño isquémico. Estos resultados abren la vía a posteriores investigaciones en neuroprotección y mecanismos apoptóticos inducidos por la isquemia cerebral.

La identificación de un panel de biomarcadores plasmáticos que pudieran predecir la evolución neurológica del paciente durante la fase aguda del ictus permitiría al equipo médico anticiparse al desarrollo de complicaciones y, por tanto, seleccionar a aquellos pacientes que más puedan beneficiarse del ingreso en las Unidades de Ictus.

Bibliografía

1. Hacke W, Schwab S, Horn M *et al.* 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch. Neurol.*, 1996, 53(4), 309-15.
2. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E *et al.* Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol.*, 2007, 6(3), 215-22.
3. Oei HS, van der Meer IM, Hofman A *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam study. *Circulation*, 2005, 111, 570-5.
4. Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH. Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology*, 2009, 73(5), 393-9.
5. Castillo J, Alvarez-Sabín J, Martínez-Vila E, Montaner J, Sobrino T, Vivancos J; MITICO study investigators. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J. Neurol.*, 2009, 256(2), 217-24.
6. Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA *et al.* Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke*, 2006, 37(5), 1205-10.
7. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM *et al.* Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.*, 2004, 4, 2.
8. Wang JY, Zhou DH, Li J *et al.* Association of soluble intercellular adhesion molecule 1 with neurological deterioration of ischemic stroke: The Chongqing Stroke Study. *Cerebrovasc. Dis.*, 2006, 21(1-2), 67-73.
9. Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke*, 1999, 30(1), 93-9.
10. Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, De los Rios J, Robles A, Exposito L. Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: Description of the technique

- and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma*, 2006, 23(10), 1510-7.
11. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Kirkpatrick PJ, Pickard JD. How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? *Physiol. Meas.*, 2002, 23(2), R75-109.
12. Reinstrup P, Stahl N, Mellergard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH. Intracerebral microdialysis in clinical practice: Baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery*, 2000, 47, 701-9.
13. Tisdall MM, Smith M. Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool. *Br. J. Anaesth.*, 2006, 97(1), 18-25.
14. Maurer MH, Haux D, Unterberg AW, Sakowitz OW. Proteomics of human cerebral microdialysate: From detection of biomarkers to clinical application. *Proteomics Clin. Appl.*, 2008, 2, 437-43.
15. Maurer MH. Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). *Mass Spectrom. Rev.*, 2010, 29(1), 17-28.
16. Maurer MH, Berger C, Wolf M *et al.* The proteome of human brain microdialysate. *Proteome Sci.*, 2003, 1(1), 7.
17. Maurer MH, Haux D, Sakowitz OW, Unterberg AW, Kuschinsky W. Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage: Preliminary results of a proteome-wide screening. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, 27(10), 1675-83.
18. Dayon L, Hainard A, Licker V *et al.* Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.*, 2008, 80(8), 2921-31.
19. Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke – The National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke*, 2006, 37(10), 2508-13.
20. Lamers KJB, Vos P, Verbeek MM, Rosmalen F, van Geel WJA, van Engelen BGM. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in

- cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res. Bull.* 2003, 61(3), 261-4.
21. Ni L, Lü J, Hou LB *et al.* Cystatin C, associated with hemorrhagic and ischemic stroke, is a strong predictor of the risk of cardiovascular events and death in Chinese. *Stroke*, 2007, 38(12), 3287-8.
22. Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin. Chem.*, 2010, 56(3), 451-8.
23. Tanaka Y, Marumo T, Omura T, Yoshida S. Relationship between cerebrospinal and Peripherals S100B levels alter focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, 2008, 436(1), 40-3.
24. Wood ZA, Schroder E, Harris JR, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.*, 2003, 28(1), 32-40.
25. Power JHT, Asad S, Chataway TK *et al.* Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol.*, 2008, 115(6), 611-22.
26. Sarafian TA, Verity MA, Vinters HV *et al.* Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J. Neurosci. Res.*, 1999, 56(2), 206-12.
27. Basso M, Giraudo S, Corpillo D, Bergamasco B, Lopiano L, Fasano M. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics*, 2004, 4(12), 3943-52.
28. Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.*, 2003, 967(1-2), 152-60.
29. Schreibelt G, van Horssen J, Haseloff RF *et al.* Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 45(3), 256-64.
30. Turck N, Burkhard PR, Robin X *et al.* Early elevation of serum GSTP and NDKA levels predict stroke events and outcome. 5th International Conference on Biochemical Markers for Brain Damage, May 11-14, 2009, Lund, Sweden.
31. Turck N, Burkhard PR, Robin X *et al.* Blood glutathione S-transferase- π predicts stroke severity and outcome. *Submitted for publication*, 2010.

32. Kim YJ, Lee WS, Ip C, Chae HZ, Park EM, Park YM. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH₂-terminal kinase signalling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH₂-terminal kinase complex. *Cancer Res.*, 2006, 66(14), 7136-42.
33. Ralat LA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry*, 2006, 45(2), 360-72.
34. Berger C, Dohmen C, Maurer MH, Graf R, Schwab S. Cerebral microdialysis in stroke. *Nervenarzt*, 2004, 75(2), 113-23.
35. da Silva SF, Correa CL, Tortelote GG, Einicker-Lamas M, Martinez AMB, Allodi S. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda). *Biol. Cell*, 2004, 96(9), 727-34.
36. Burgess JA, Lescuyer P, Hainard A *et al.* Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.*, 2006, 5(7), 1674-81.
37. Zougman A, Pilch B, Podtelejnikov A *et al.* Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J. Proteome Res.*, 2008, 7(1), 386-99.

Información suplementaria

Proteína	Ratio IC/PI (Exp _a)	Ratio IC/PI (Exp _b)
Alpha-1-acid glycoprotein 1 precursor	0,48	0,47
Alpha-1-antitrypsin precursor	0,61	0,40
Alpha-1B-glycoprotein precursor		0,46
Carbonic anhydrase 1	0,45	1,60
Ceruloplasmin precursor		0,44
Fibrinogen beta chain precursor		0,46
Fibrinogen gamma chain precursor		0,41
Haptoglobin precursor	0,46	0,36
Hemoglobin subunit alpha	0,34	0,70
Hemoglobin subunit beta	0,37	0,80
Ig kappa chain C region	0,51	0,28
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,72	0,39
Serotransferrin precursor	0,42	0,50
Serum albumin precursor	0,40	0,33

Tabla S1. Ratios IC/PI disminuidos en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes; en negrita, proteínas que se hallaron significativamente disminuidas en ambos pacientes.

Proteína	Ratio IC/CT (Exp _c)	Ratio IC/CT (Exp _d)
Alpha-1-antitrypsin precursor		0,49
Alpha-2-macroglobulin precursor		0,36
Beta-2-microglobulin precursor	0,80	0,44
Carbonic anhydrase 1	0,29	4,68
Chromogranin-A precursor	0,29	
Complement C3 precursor		0,43
Cystatin-C precursor	0,62	0,03
Dermcidin precursor	0,85	0,35
Fibrinogen alpha chain precursor	0,46	2,33
Fibrinogen beta chain precursor		0,38
Glial fibrillary acidic protein	4,13	0,37
Haptoglobin precursor	0,83	0,14
Ig gamma-2 chain C region		0,18
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,99	0,48
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,97	0,43
Lambda-chain precursor		0,21
Myelin basic protein		0,30
Prostaglandin-H2 D-isomerase precursor	0,27	0,46
Putative uncharacterized protein		0,15
Serotransferrin precursor	1,47	0,42
Serum albumin precursor	1,17	0,38
SNC73 protein		0,30

Tabla S2. Ratios IC/CT disminuidos en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes; en negrita, proteínas que se hallaron significativamente disminuidas en ambos pacientes.

Proteína	Ratio PI/CT (Exp _e)	Ratio PI/CT (Exp _f)
Alpha-1-antitrypsin	1,05	0,35
Alpha-1-acid glycoprotein 1 precursor	1,38	0,38
Alpha-2-macroglobulin precursor	0,68	0,36
Alpha-enolase	0,45	
Apolipoprotein E precursor	0,30	
Beta-2-microglobulin	0,92	0,25
Beta-Ala-His dipeptidase precursor	0,32	
Ceruloplasmin precursor		0,45
Clusterin	0,49	
Complement component 3	0,72	0,48
Complement factor B precursor	1,15	0,36
Cystatin-C precursor	0,17	0,38
Dermcidin precursor		0,34
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 precursor	0,46	
Glial fibrillary acidic protein	0,31	2,33
Haptoglobin precursor		0,45
Hemoglobin subunit alpha	0,11	0,55
Hemoglobin subunit beta	0,11	0,59
Ig gamma-2 chain C region	0,87	0,22
Insulin-like growth factor-binding protein 7 precursor	0,02	
Kallikrein-6 precursor		0,41
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1,08	0,33
Lambda-chain precursor	0,89	0,35
Neutrophil defensin 1 precursor	0,17	
Pigment epithelium-derived factor precursor	0,15	
Prostaglandin-H2 D-isomerase precursor	0,20	0,64
Putative uncharacterized protein DKFZp686I15212		0,37
Serotransferrin precursor	0,91	0,36

Tabla S3. Ratios PI/CT disminuidos en las muestras de MDs. En blanco, proteínas que no fueron identificadas/cuantificadas en los MDs correspondientes; en negrita, proteínas que se hallaron significativamente disminuidas en ambos pacientes.

