



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Aplicaciones proteómicas para el descubrimiento de biomarcadores diagnósticos en ictus

VÍCTOR LLOMBART SEBASTIÀ

DIRECTORES:

Dr. Joan Montaner Villalonga

Dra. Mar Hernández Guillamón

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	El ictus	3
1.1	Subtipos.....	3
1.1.1	Ictus isquémico.....	4
1.1.2	Ictus hemorrágico.....	5
1.2	Diagnóstico.....	5
1.3	Tratamiento primario.....	6
2.	La unidad neurovascular	8
2.1	Alteraciones de la unidad neurovascular tras el ictus isquémico	9
2.2	Alteraciones de la unidad neurovascular tras el ictus hemorrágico	10
3.	Modelos experimentales de ictus	11
3.1	In-vitro	12
3.1.1	Línea celular hCMEC/D3.....	13
3.2	In-vivo.....	13
3.2.1	Modelos <i>in-vivo</i> de isquemia cerebral	13
3.2.2	Modelos <i>in-vivo</i> de hemorragia cerebral	14
4.	Biomarcadores en el ictus	15
4.1	Fases del descubrimiento y validación de un nuevo biomarcador	16
4.2	Biomarcadores para el diagnóstico del ictus	18
4.2.1	Propiedades de los biomarcadores diagnósticos en el ictus.....	18
4.2.2	Herramientas estadísticas	19
5.	Aplicación de la proteómica para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en el ictus	20
5.1	Tipos de muestras	21
5.1.1	Fluidos biológicos	21
5.1.2	Tejido.....	22
5.1.3	Cultivos celulares.....	22
5.2	Técnicas proteómicas utilizadas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en ictus	23
5.2.1	Proteómica basada en electroforesis bidimensional	24
5.2.2	Proteómica basada en <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i> (MALDI) MS	28
5.2.3	Proteómica basada en métodos de marcaje.....	29
5.2.4	<i>Label free</i>	31

Índice

5.2.5 Arrays de afinidad	31
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	39
Muestras	41
- Cultivos celulares.....	41
- Animales	41
- Pacientes	42
Técnicas de <i>discovery</i>	42
- Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Cell culture	42
- MALDI- <i>imaging</i>	43
- Librería de anticuerpos Searchlight.....	44
- Label-free.....	44
- Human Protein atlas.....	44
Técnicas de confirmación.....	45
- ELISA	45
- Western Blot.....	45
- Inmunohistoquímica	45
- Inmunofluorescencia.....	45
Estadística.....	46
4. COPIA DE PUBLICACIONES	47
1) Characterization of secretomes from a human blood brain barrier endothelial cells in-vitro model after ischemia by stable isotope labeling with aminoacids in cell culture (SILAC)..	49
2) Plasmatic RBP4 and GFAP as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage.....	79
5. DISCUSIÓN.....	95
5.1 Uso de biomarcadores para el diagnóstico del ictus	99
5.2 Análisis mediante distintas aproximaciones proteómicas.....	100
5.2.1 Electroforesis bidimensional acoplada a MS.....	100
5.2.2 Marcaje SILAC.....	101
5.2.3 MALDI <i>imaging</i>	101
5.2.4 Cuantificación <i>label-free</i>	103
5.2.5 Arrays de afinidad	104

5.3 Aproximaciones <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> para el descubrimiento de nuevos biomarcadores diagnósticos del ictus	104
5.3.1 Análisis del secretoma celular en un modelo endotelial <i>in-vitro</i> de barrera hematoencefálica	104
5.3.2 Análisis de la distribución y abundancia relativa de proteínas en el tejido cerebral de un modelo <i>in-vivo</i> de isquemia cerebral.....	106
5.3.3 Análisis del proteoma de tipos celulares específicos aislados de infarto y la región contralateral sana de cerebro humano.....	108
5.4 Uso de biomarcadores para diferenciar el ictus isquémico y el ictus hemorrágico	109
5.5 Futuro de los biomarcadores para el diagnóstico del ictus	110
6. CONCLUSIONES	113
7. BIBLIOGRAFÍA.....	117
8. ABREVIACIONES	137

1. INTRODUCCIÓN

1. El ictus

Se denomina ictus a la alteración brusca de la circulación cerebral que impide la correcta distribución de oxígeno y nutrientes en el cerebro. Esta alteración está causada por la oclusión de un vaso o la rotura del mismo y puede perturbar la función celular en el área del cerebro afectada de una forma transitoria o definitiva.

Los síntomas neurológicos más comunes que aparecen tras sufrir un ictus incluyen pérdida de fuerza y sensibilidad en la mitad del cuerpo, afectación del campo visual, trastornos del lenguaje y vértigo entre muchos otros, y el hecho de que parezca uno u otro dependerá de la región cerebral implicada.

En nuestro país, el ictus presenta una incidencia anual de 187 casos por cada 100.000 habitantes [1]. Esta enfermedad supone la segunda causa de muerte entre población general (27.850 muertes, [2]) y la primera en mujeres (16.257 muertes, [2]), precedida únicamente por las enfermedades isquémicas de corazón [2]. A su elevada incidencia y mortalidad se le suma el hecho de ser la primera causa de invalidez e incapacidad a largo plazo. Desde el punto de vista socioeconómico, esto supone una importante carga global para el sistema sanitario, no sólo porque consume entre el 3% y el 4% del gasto sanitario, sino también por la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad.

Los principales factores de riesgo asociados al ictus pueden ser clasificados como factores modificables y factores no modificables [3]. Entre los primeros destacan la hipertensión, la hipercolesterolemia, las alteraciones del ritmo cardíaco, la diabetes mellitus, el síndrome metabólico o la enfermedad renal crónica, todos ellos comunes en la mayoría de enfermedades cardiovasculares. A éstos se les suman el consumo de alcohol y tabaco además de aquellos factores de riesgo asociados con frecuencia al estilo de vida, como la dieta, el sobrepeso o la inactividad física. Por otro lado, factores no modificables como la edad, el género o la etnia conllevan una predisposición a esta patología, así como algunas variantes genéticas, ya sean monogénicas (p. ej. CADASIL o la enfermedad de Fabry) [4] o, más comúnmente, poligénicas (p.ej. en genes involucrados en la cascada de coagulación o en el metabolismo lipídico) [5].

1.1 Subtipos

Dependiendo de cuál sea el mecanismo causante de la afectación del flujo cerebral el ictus se clasifica en ictus **isquémico** o ictus **hemorrágico** (Figura 1).

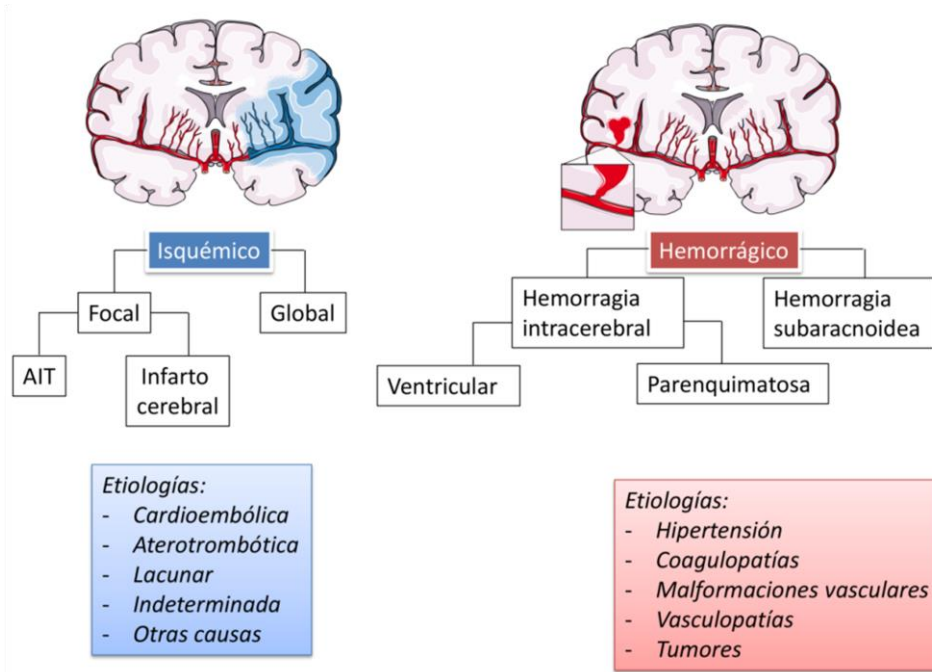


Figura 1: Subtipos de ictus y etiologías. AIT: ataque isquémico transitorio

1.1.1 Ictus isquémico

El ictus **isquémico** se caracteriza por la interrupción del flujo arterial a una región determinada del cerebro debido a una oclusión vascular y representa aproximadamente el 85% de casos diagnosticados [3].

Según los criterios TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) la etiología del ictus isquémico se clasifica en distintos subtipos dependiendo del origen de la oclusión [6]:

- Ictus cardioembólico: un coágulo rico en fibrina se origina en el corazón debido a estasis sanguínea, a una superficie valvular anormal o a la alteración del paso de circulación venosa a circulación arterial. Tras su formación, el coágulo viaja a través del torrente sanguíneo hasta ocluir una arteria cerebral. El ictus cardioembólico representa el subtipo de ictus isquémico más grave y suele ser predominantemente cortical [7].
- Ictus aterotrombótico: un trombo se forma durante la rotura o activación de una placa de ateroma. Este evento ocurre habitualmente en la bifurcación carotídea, el arco aórtico o, en menor grado, en arterias intracraneales y suele afectar a las regiones cortical o subcortical [8].
- Ictus lacunar: el flujo sanguíneo a través del lumen de pequeñas arterias y arteriolas penetrantes queda interrumpido debido a su oclusión por un trombo o por un estrechamiento del pequeño vaso causado principalmente por lipohialinosis.

- Ictus de etiología indeterminada: el ictus isquémico es de causa indeterminada cuando coexisten diversas causas posibles o bien cuando no ha podido hallarse ninguna causa que explique el evento. Suele tener localización cortical o subcortical, en el territorio carotídeo o vertebrobasilar [8].
- otras causas: este grupo incluye eventos isquémicos producidos por patologías menos habituales como disección, coagulopatías y vasculitis o enfermedades hereditarias como moya-moya o displasia fibromuscular.

1.1.2 Ictus hemorrágico

El ictus **hemorrágico** representa aproximadamente un 15% de los casos y se caracteriza por la rotura de la pared arterial con la consiguiente liberación de sangre desde la luz del vaso hasta el espacio intercelular del parénquima cerebral. Esto conlleva la formación de hematoma que induce la disrupción mecánica de elementos celulares, junto con la aparición de edema, inflamación, necrosis y apoptosis celular [9]. A pesar de ser el subtipo de ictus menos frecuente, los pacientes que sufren un ictus hemorrágico presentan una afectación más grave y un peor pronóstico a corto y largo plazo (aproximadamente el 40% de los pacientes fallecen durante el primer mes [10], y sólo un 20% es independiente a los 6 meses del ictus [11]).

Las principales etiologías del ictus hemorrágico incluyen [12]:

- Hipertensión: responsable de debilitar y dañar las paredes de las arteriolas y vasos perforantes. Representa la principal causa de ictus hemorrágico, aunque su incidencia ha descendido de forma substancial en los últimos años presumiblemente debido al mejor control de la hipertensión arterial por parte de los pacientes.
- Coagulopatías: ya sean hereditarias como la hemofilia o adquiridas como las derivadas de una disfunción hepática o del tratamiento con anticoagulantes, entre otros.
- Malformaciones vasculares: como aneurismas o angiomas cavernosos.
- Vasculopatías: la principal vasculopatía asociada a la aparición de hemorragias cerebrales es la angiopatía amiloide (CAA, *Cerebral Amyloid Angiopathy*), causada por la acumulación de proteína beta-amiloide en la pared de las arteriolas.
- Tumores: causantes del 4% de las hemorragias cerebrales no traumáticas.

1.2 Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico del ictus se lleva a cabo mediante neuroimagen a través de tomografía computarizada (TC) y, en menor medida, resonancia magnética (RM). Resulta imposible identificar de forma fiable los pacientes que sufren ictus basándonos únicamente en

variables clínicas, por lo que la neuroimagen se ha convertido en el “gold standard” para el diagnóstico de esta patología.

A través de TC un infarto de naturaleza isquémica aparece como una hipodensidad mientras que una hemorragia se muestra hiperdensa en comparación con el parénquima colindante [13]. En algunos casos es posible que tras un episodio transitorio de disfunción neurológica no se halle ninguna señal patológica en la neuroimagen, lo que se conoce como ataque isquémico transitorio. El diagnóstico por neuroimagen también permite distinguir el ictus de otras patologías con síntomas similares. Este grupo conocido como *mimics* representa aproximadamente el 20-25% de las sospechas de ictus dependiendo del contexto que se considere (ambulancia, centro de atención primaria, sala de urgencias, etc) [14] y está compuesto por un conjunto extremadamente heterogéneo de afectaciones neurológicas que incluyen crisis epilépticas, tumores o distintas enfermedades tóxico-metabólicas, entre otros (Tabla 1)[15].

Diagnóstico	% de <i>mimics</i>
Crisis epiléptica	19,6
Síncope	12,2
Sepsis	9,6
Cefalea benigna	9
Tumor cerebral	8,2
Funcional	7,4
Desorden metabólico	6,2
Neuropatía	4,6
Vértigo	3,2
Demencia	2,3
Hemorragia extra o subdural	1,8
Drogas y alcohol	1,6
Amnesia global transitoria	1,4
otros	12,9

Tabla 1: Proporción de cada subtipo de *mimics* presente en una cohorte multicéntrica de 813 pacientes incluidos en esta categoría. Adaptada de Gibson et al [15]

1.3 Tratamiento primario

Hasta hoy, la única terapia aprobada para el ictus isquémico agudo es el tratamiento trombolítico mediante la administración intravenosa de activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA, *recombinant tissue plasminogen activator*) [16,17]. El rt-PA potencia la trombolisis a través de su actividad proteasa, transformando el plasminógeno en plasmina, que a su vez cataliza la degradación de la fibrina y el fibrinógeno. Esto conlleva finalmente la disolución del coágulo permitiendo la recanalización del vaso ocluido y la reperusión del tejido isquémico, mejorando así el pronóstico del paciente de una forma sustancial. Sin embargo, es importante destacar que menos del 10% de los pacientes puede beneficiarse de la administración de rt-PA intravenoso. Las razones que explican este bajo porcentaje son los estrictos criterios de inclusión para el tratamiento trombolítico que incluyen una estrecha ventana terapéutica de 4,5 horas desde el inicio de los síntomas, tener menos de 80 años de edad o que el paciente no se encuentre bajo ningún tratamiento con antiagregantes o anticoagulantes. En caso de que un paciente reciba rt-PA, los principales riesgos a los que se

enfrenta son la no recanalización o la posible aparición de transformaciones hemorrágicas. Estas últimas suponen uno de los efectos secundarios más graves derivados de la trombolisis ya que se asocian con un 50% de mortalidad en aquellos pacientes que las sufren [18]. Siguiendo criterios radiológicos, estas transformaciones hemorrágicas sufridas se pueden clasificar en [19]:

- Infartos hemorrágicos de tipo I (HI-1, *hemorrhagic infarct type 1*): con petequias en el borde del infarto.
- Infartos hemorrágicos de tipo II (HI-2, *hemorrhagic infarct type 2*): aparición de petequias dentro de la zona infartada pero sin efecto de ocupación de espacio.
- Hematoma parenquimatoso tipo I (PH-1, *parenchymal hematoma type 1*): con tamaño menor al 30% del infarto y sin efecto de ocupación.
- Hematoma parenquimatosos tipo II (PH-2, *parenchymal hematoma type 2*): con tamaño mayor al 30% del infarto y con efecto de ocupación.

Siendo los de peor pronóstico los hematomas parenquimatosos.

A parte de la administración intravenosa de rt-PA, existen otros tratamientos dirigidos a conseguir la revascularización de la región cerebral afectada y con los que se han realizado ya diversos ensayos clínicos [20]. Éstos incluyen la administración de trombolíticos con más especificidad por la fibrina y menos neurotoxicidad, la co-administración de trombolíticos junto con potenciadores del flujo microcirculatorio, la trombolisis complementada con ultrasonidos o la trombectomía endovascular mecánica. De todos ellos hay que destacar la trombectomía endovascular mecánica como el que presenta resultados más prometedores y que ha revolucionado el tratamiento del ictus en el último año al conseguir un mejor ratio de recanalización acompañado de un mejor pronóstico en los pacientes que se sometieron a trombectomía mecánica junto con rt-PA [21–24].

En contraste con el ictus isquémico, actualmente no hay ningún tratamiento aprobado ni que se haya demostrado efectivo para tratar los ictus de naturaleza hemorrágica en fase aguda. Sin embargo existe cierta evidencia de que la reducción de la presión sanguínea en un estadio temprano resulta segura, tiende a mejorar el pronóstico a los tres meses y atenúa el crecimiento del hematoma [25]. Otras intervenciones que suelen realizarse ante un ictus hemorrágico son la corrección de la hemostasia ante ciertas coagulopatías mediante la administración de factores de coagulación o plaquetas, la reducción de la presión intracraneal a través de ciertos medicamentos o intervención quirúrgica, o el control de aspectos como la temperatura corporal y la glicemia [26].

2. La unidad neurovascular

El concepto “Unidad Neurovascular” hace referencia al sistema compuesto por neuronas, interneuronas, astrocitos, lámina basal, musculatura lisa, pericitos, células endoteliales de la microvasculatura cerebral y matriz extracelular (Figura 2). En esta compleja estructura cada uno de sus componentes se encuentra interconectado de forma íntima, dinámica y recíproca a los otros, actuando coordinadamente para regular de manera eficiente la homeostasis cerebral [27]. Cada elemento individual que compone la unidad neurovascular posee un rol específico y activo en condiciones fisiológicas. Las **neuronas** e interneuronas controlan el tono vascular y, por lo tanto, el aporte sanguíneo al área que las rodea gracias a su interacción con la **microvasculatura** y los **pericitos**. En estrecha relación con las neuronas se encuentran las células de la **glía**, las cuales desempeñan una importante función trófica y metabólica activa, y los **oligodendrocitos**, encargados básicamente del sostén y unión de las vainas de mielina. La interacción de las neuronas con la microvasculatura se lleva a cabo a través de los **astrocitos** cuya función resulta indispensable para mantener las interconexiones físicas (a través de sus prolongaciones y pies terminales) y químicas (respondiendo a los niveles de glutamato y GABA, propagando olas de calcio o liberando prostaglandinas, ATP y NO), por lo que representan mucho más que un mero soporte estructural. De modo similar, los **pericitos** que se encuentran en estrecho contacto con las células de la microvasculatura ofrecen soporte anatómico y funcional mediante la secreción de factores de crecimiento y moléculas de adhesión. También las **células endoteliales**, que antes se consideraron componentes con un rol pasivo, tienen un papel extremadamente importante en el control del tono vascular a través de la secreción de factores tróficos y vasoactivos (p.ej. endotelina, trombohexano o NO), la propagación de los cuales se ve muy influenciada a su vez por la **lámina basal**.

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral representan los componentes principales de la barrera hematoencefálica (BBB, *brain-blood barrier*) y resultan las mayores responsables del control de su permeabilidad, pero no son los únicos encargados, ya que actúan en cooperación con los pericitos, astrocitos, membrana basal y células de la glía [28]. La BBB actúa como una barrera anatómica cuya principal función es la de regular de forma estricta el influjo y eflujo de solutos en el cerebro preservando la homeostasis adecuada para las funciones neuronales. La estrecha colaboración entre los distintos elementos que componen la BBB permite una regulación óptima del tráfico molecular a través de la ella.

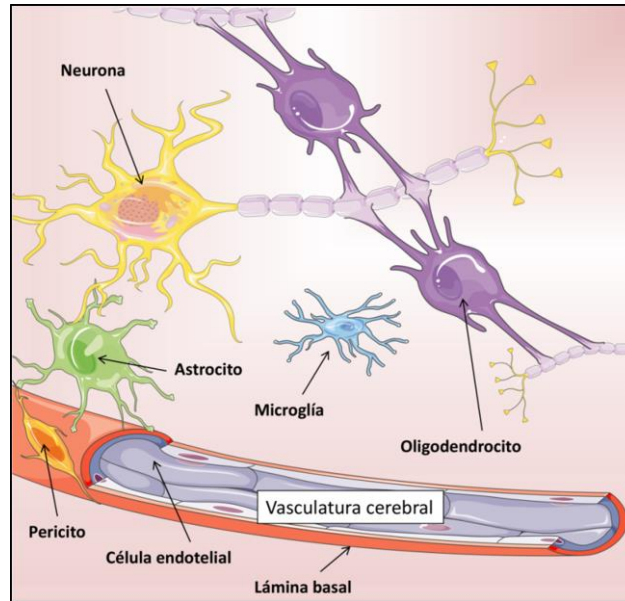


Figura 2: Elementos que componen la unidad neurovascular

2.1 Alteraciones de la unidad neurovascular tras el ictus isquémico

Inmediatamente después de sufrir un ataque isquémico, la drástica reducción del aporte de oxígeno y nutrientes a la región central del infarto (*core*) conlleva una muerte celular rápida, mientras que la región colindante (*penumbra*) sufre una pérdida moderada del aporte energético debido a la circulación colateral (Figura 3). Gracias a este fenómeno la penumbra representa un área potencialmente salvable en fase aguda, siempre que la isquemia no se mantenga durante tiempos prolongados. El conocimiento de las principales moléculas implicadas en los mecanismos de muerte celular debido a la isquemia es primordial para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a recuperar la región de penumbra que se encuentra metabólicamente comprometida pero que sigue siendo susceptible a ser recuperada.

Existen diversos mecanismos implicados en mediar la muerte celular debido a la isquemia [29]. La excitotoxicidad provocada por la **acumulación de glutamato** juega un papel primordial en la progresión del daño tisular a través de la penumbra, ya que tanto neuronas como oligodendrocitos son extremadamente sensibles a la sobre-estimulación de los receptores de glutamato NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos. El **estrés oxidativo** debido a la acumulación de radicales libres tiene también un claro efecto sobre la viabilidad neuronal debido al ataque de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) a elementos celulares. Algunas células, como los astrocitos o los oligodendrocitos, poseen una gran

capacidad de generar antioxidantes haciéndolas esenciales para la supervivencia neuronal, mientras que otros, como las células endoteliales, constituyen una gran fuente de ROS. Ante un episodio isquémico también se induce una potente **respuesta inflamatoria** tras la cual se produce el reclutamiento y extravasación de leucocitos desde el torrente circulatorio hacia el parénquima cerebral. Estas células desencadenan un efecto multiplicador ya que exacerban la producción de mediadores pro-inflamatorios. Finalmente, durante un episodio isquémico se produce una **disrupción de la BBB** debida a la alteración de las uniones estrechas, a la degradación de la lámina basal por parte de **metaloproteasas** (MMP, *matrix metalloproteinases*), y a la sobreproducción de compuestos como el óxido nítrico, factores de crecimiento vascular endotelial, moléculas de adhesión leucocitaria o citoquinas pro-inflamatorias [30]. Esta disrupción conlleva un aumento de la permeabilidad paracelular y promueve la aparición de posibles complicaciones como el edema y/o transformaciones hemorrágicas secundarias.

2.2 Alteraciones de la unidad neurovascular tras el ictus hemorrágico

Tras la lesión vascular causante de la hemorragia intracerebral se produce una compresión de las estructuras anatómicas cerebrales y un aumento de la **presión intracraneal** llevando a la aparición de hernias y a la **disrupción mecánica de axones** y células de la glía (Figura 3).

A esta fase primaria de daño mecánico le suceden una serie de daños cerebrales secundarios derivados de la respuesta fisiológica a la hemorragia [31].

A nivel sistémico se activan el sistema nervioso simpático y el **eje hipotálamo-pituitario adrenal**. En cambio, a nivel local se produce una **hiperpermeabilidad de la BBB** promovida por componentes procedentes de la sangre. La trombina promueve la fosforilación de quinasas mientras el hierro de la hemoglobina favorece la generación de ROS que atacan las células del endotelio y facilita la aparición de **edema vasogénico**. Estos componentes de la sangre también producen una **respuesta inflamatoria** exacerbada que se vehicula principalmente a través de la sobreexpresión de moléculas de adhesión endotelial, la activación del complemento y el aumento de infiltración de leucocitos que actúan como importantes fuentes de citoquinas pro-inflamatorias y **MMPs**. Es importante destacar el papel dual que juega la microglía en el contexto de la hemorragia intracerebral. Mientras que por un lado su rápida activación tras la hemorragia favorece la consolidación de un ambiente pro-inflamatorio, por otro juega un papel fundamental en la fagocitosis del hematoma y la reparación tisular. Como

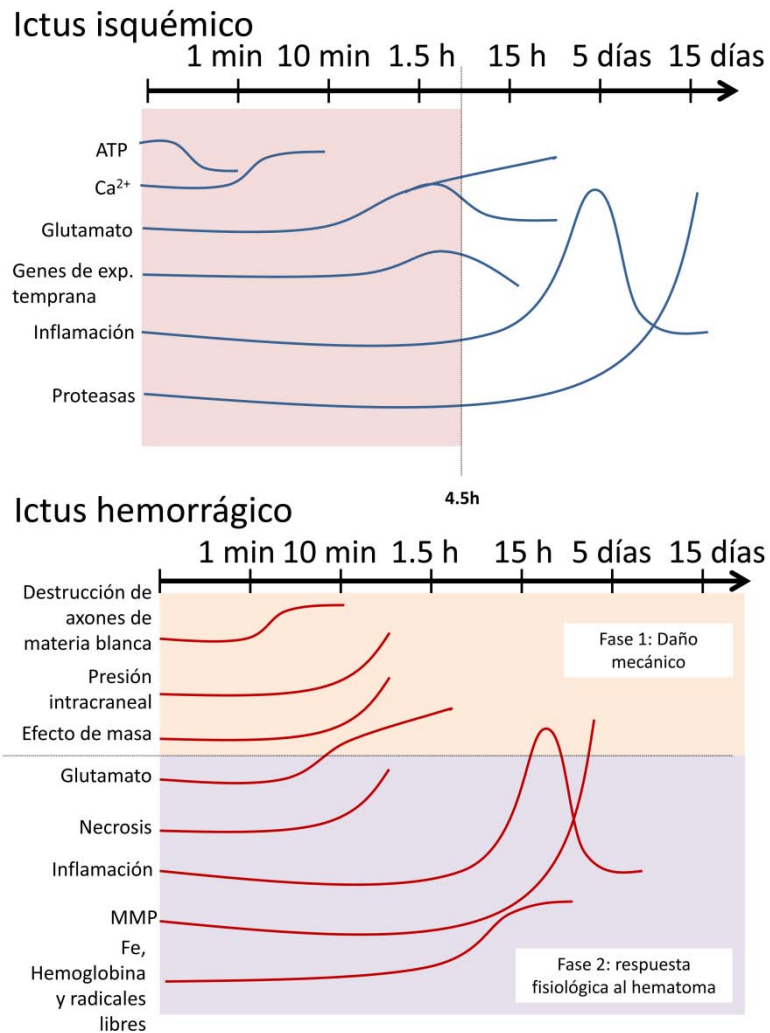


Figura 3. Curso temporal de los eventos posteriores a la isquemia y a la hemorragia cerebral.

ATP: adenosin trifosfato; Ca²⁺: iones de calcio, MMP: metaloproteasas de matriz; Fe: hierro

consecuencia de la hemorragia también se produce una **alteración en la vasoreactividad** del endotelio con un incremento de la vasoconstricción como resultado de la despolarización de la musculatura vascular lisa [32].

3. Modelos experimentales de ictus

Los modelos experimentales facilitan el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la patología neurovascular. Dichos modelos pueden agruparse en dos categorías: modelos *in-vitro* y modelos *in-vivo*.

3.1 In-vitro

Los modelos *in-vitro* de isquemia cerebral facilitan la investigación sobre la patología fuera del organismo vivo. Se consideran una importante herramienta para el estudio a nivel tisular y celular de los procesos biológicos cerebrales manteniendo un control mucho más preciso de las variables experimentales. Poseen la limitación intrínseca de no poder reproducir de forma completa las complejas condiciones presentes *in-vivo*, pero esta mayor simplicidad aporta un contexto mucho más específico en el que analizar las funciones involucradas en la isquemia.

Los modelos *in-vitro* de isquemia cerebral consisten, principalmente, en la incubación de rodajas de tejido o cultivos celulares a una muy baja concentración de oxígeno (hipoxia) o en ausencia total de éste (anoxia). Además se puede omitir la glucosa en el medio de cultivo sometiendo así a las células a una privación simultánea de oxígeno y glucosa. Mediante estas aproximaciones se pretende asemejar la interrupción del aporte de oxígeno y nutrientes que sucede en el tejido cerebral durante un episodio isquémico. Estas condiciones experimentales se alcanzan a través del uso de cámaras de cultivo capaces de mantener y regular la presión relativa gases generando atmósferas con 5% de CO₂ y un O₂ menor del 0.5%.

Dichas condiciones pueden aplicarse sobre **cultivos tisulares (organotípicos)**, cultivos **celulares primarios**, cultivos de **líneas celulares** o cultivos **mixtos**. Tanto los cultivos tisulares como los cultivos primarios están basados en células funcional y morfológicamente maduras. Los cultivos tisulares consisten en el cultivo de parénquima cerebral en sistemas experimentales *ex-vivo* manteniendo la organización tridimensional fisiológica. En cambio, los cultivos primarios consisten en la obtención de células a partir de la disgregación del tejido. En claro contraste con los cultivos tisulares y los primarios, los cultivos de líneas celulares se basan en células transformadas genéticamente y con una gran capacidad de expansión, pero que no conservan algunas de las características del tipo celular original. Finalmente los cultivos mixtos permiten explorar las interacciones entre distintos tipos celulares, ya sean procedentes de cultivos primarios o de líneas celulares immortalizadas.

Debido a su exclusiva estructura y al papel preponderante de la BBB en el desarrollo de la isquemia cerebral, existe un gran interés en la reproducción de modelos *in-vitro* de este sistema. Estos modelos se han logrado elaborar a partir de cerebros aislados e incluso a partir de diversas líneas celulares immortalizadas [33–37]. Puesto que las células endoteliales son elementos principales en la formación de la BBB, se han utilizado cultivos de este tipo celular como modelos más simples en el estudio de la respuesta a la isquemia. A través del co-cultivo

de éstas con astrocitos, microglía o pericitos se ha logrado incluso generar modelos tridimensionales de la BBB [38].

3.1.1 Línea celular hCMEC/D3

La línea celular inmortalizada humana *Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line D3* hCMEC/D3 mantiene muchas de las características estructurales, bioquímicas y funcionales de las células de la microvasculatura cerebral humana [39]. Bajo condiciones de confluencia, dichas células han mostrado expresión de una serie de marcadores endoteliales que incluyen moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*), la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1, la *Vascular Adhesion Molecule-1*), la ocludina, la proteína de *zónula ocludens 1*, etc) [39–41]. Estas características convierten a la línea celular hCMEC/D3 en un buen modelo endotelial de BBB [39,42,43]. Como reflejo de ello, varios trabajos han empleado este modelo *in-vitro* para el estudio de los procesos biológicos involucrados en la función endotelial cerebral humana [44–46], y para la exploración de la respuesta funcional de la BBB bajo diversos estímulos [47–49].

3.2 In-vivo

En la investigación pre-clínica del ictus los modelos experimentales *in-vivo* son ampliamente usados porque, en contraste con los modelos *in-vitro*, reproducen fielmente los procesos biológicos que se suceden en esta patología manteniendo el contexto y la complejidad fisiológica. El uso de modelos *in-vivo* ha permitido un enorme avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos del ictus, así como en el desarrollo de estrategias terapéuticas o de diagnóstico.

Existe una gran variedad de modelos *in-vivo* de ictus en distintas especies pero los roedores (ratón y rata) son los que se utilizan con mayor frecuencia. Su anatomía vascular similar a la de los humanos, la amplia variedad de tests neurológicos estandarizados, sus reducidos costes de mantenimiento junto con la mayor aceptación ética de su uso frente al de otros mamíferos, son las principales razones que han llevado a la implantación de los modelos experimentales de ictus en roedores [50]. Es importante destacar que los modelos *in-vivo* utilizados para el estudio de la isquemia y la hemorragia cerebral poseen claros contrastes ya que los mecanismos implicados difieren ampliamente.

3.2.1 Modelos *in-vivo* de isquemia cerebral

Los modelos *in-vivo* de isquemia cerebral se pueden clasificar en modelos de **isquemia global** o **focal**, dependiendo de territorio cerebral afectado [51]. Estos modelos ofrecen la oportunidad de estudiar los mecanismos, la prevención y el tratamiento de la isquemia cerebral.

Introducción

- Modelos de isquemia global: se expone la totalidad del cerebro a la privación del aporte sanguíneo. Esto se consigue, entre otros métodos, a través de la decapitación, el ahogamiento, la parada cardíaca o mediante la oclusión de ambas carótidas junto con las arterias vertebrales.
- Modelos de isquemia focal: se caracterizan por la reducción del aporte sanguíneo a una región concreta del cerebro. La mayoría de los modelos de isquemia focal se realizan mediante la oclusión de un gran vaso cerebral como la arteria cerebral media (MCA, *middle cerebral artery*), y se caracterizan por la reducción del flujo en la corteza cerebral y en el estriado.

Estas oclusiones pueden ser temporales (con reperusión) o permanentes:

- Oclusión temporal: se realiza a través del pinzamiento de la arteria, su oclusión mediante un filamento intraluminal, aplicando presión sobre el vaso o mediante la administración de un coágulo seguido de trombolisis (Figura 4A). El tamaño y la severidad del infarto dependerán del tiempo de oclusión.
- Oclusión permanente: se lleva a cabo mediante la ligadura permanente de la arteria, la electrocoagulación o la oclusión mediante el filamento intraluminal o a través de una reacción fotoquímica tras la administración de tinte fotosensible.

3.2.2 Modelos *in-vivo* de hemorragia cerebral

Los modelos experimentales *in-vivo* de hemorragia intra-cerebral permiten profundizar en el conocimiento de los procesos fisiopatológicos involucrados y que contribuyen a un peor pronóstico como la rotura de los vasos cerebrales, la formación y crecimiento del hematoma, el traumatismo mecánico de neuronas y de la glía, la disfunción mitocondrial, la liberación de neurotransmisores y la despolarización de membrana [52]. Los modelos *in-vivo* más utilizados en el estudio de la hemorragia intra-cerebral incluyen:

- La inyección de sangre autóloga en el cerebro simulando la rápida acumulación de sangre en la región intraparenquimatosa. Este modelo permite el control del volumen del hematoma (figura 4B).
- La inyección de colagenasa para degradar la membrana basal de los vasos cerebrales imitando la expansión del hematoma.
- La inserción e inflado de un micro-globo en el parénquima cerebral para estudiar el efecto de masa del crecimiento del hematoma.
- El desgarrado de los vasos situados en la corteza cerebral mediante una aguja para reproducir hemorragias corticales.

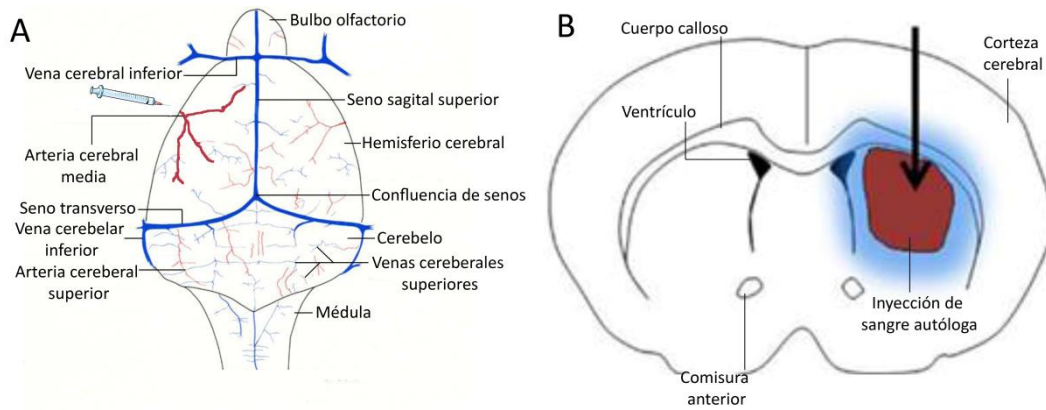


Figura 4: Representación de dos ejemplos de modelos experimentales *in-vivo* de isquemia y hemorragia cerebral. Oclusión de la arteria cerebral media mediante la compresión con aguja roma para producir una isquemia cerebral focal (A), inyección parenquimatosa de sangre autóloga (B)

4. Biomarcadores en el ictus

Un biomarcador es un indicador biológico que da información objetiva acerca del estado fisiopatológico de un paciente, del riesgo a sufrir una enfermedad o de la respuesta a una acción terapéutica. Aunque el término biomarcador puede referirse a datos clínicos o de neuroimagen, normalmente se encuentra referido a moléculas medidas en muestras biológicas. Estas moléculas pueden ser de naturaleza muy distinta (proteínas, péptidos, lípidos, metabolitos, químicos o incluso ácidos nucleicos) y generalmente se encuentran asociadas a los procesos biológicos subyacentes a la enfermedad en estudio. La utilidad de los biomarcadores en la práctica clínica ha sido sobradamente demostrada en distintos campos de la medicina. La medición de la troponina I plasmática para diagnosticar un infarto agudo de miocardio o la creatinina en orina para monitorizar la función renal, son solamente algunos ejemplos [53,54].

Sin embargo, a pesar de que en los últimos años ha aumentado de forma sustancial el interés por desarrollar nuevos biomarcadores que sean útiles en el contexto de la enfermedad neurovascular, ninguno ha logrado establecerse en la práctica clínica diaria. Existen numerosos retos a los que nos enfrentamos para el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el ictus y que hacen que la implantación clínica de candidatos prometedores no resulte sencilla. Algunos de estos retos son inherentes a la compleja biología cerebral. La BBB, aun estando estructuralmente comprometida, todavía dificulta el paso de moléculas desde el tejido dañado hasta el torrente sanguíneo, obstaculizando así su posible detección. Asimismo, el cerebro es un órgano extremadamente heterogéneo, con distintas poblaciones celulares específicas de cada región y que responden de modo diferente a la lesión. Por lo tanto existe un patrón molecular característico de cada tipo celular que añade variabilidad al pool global de moléculas

asociadas al insulto. Un problema añadido es el hecho de que los déficits funcionales que presentan los pacientes están estrechamente relacionados con la región cerebral afectada tras el ictus más que con el tamaño de la lesión. Esto dificulta poder correlacionar los niveles medidos de los biomarcadores con la gravedad del evento.

Pese a estos importantes obstáculos, actualmente se está dedicando mucho esfuerzo y cuantiosos recursos a la identificación y validación de nuevos candidatos que sean útiles en el diagnóstico del ictus, la identificación de sus etiologías, la evaluación del riesgo o para conocer el pronóstico de los pacientes. Los importantes avances logrados en los últimos años han permitido profundizar en el conocimiento de esta patología y auguran la implantación de una serie de biomarcadores en algunas de estas indicaciones. Un ejemplo relevante es la medición de copeptina plasmática para predecir el pronóstico post-isquemia [55]. De forma similar, el péptido natriurético cerebral (BNP, *Brain Natriuretic Peptide*) ha demostrado su potencial predictivo para la identificación de ictus de etiología cardioembólica [56], permitiendo la prescripción del tratamiento secundario más adecuado y prevenir recurrencias.

4.1 Fases del descubrimiento y validación de un nuevo biomarcador

El creciente desarrollo de las técnicas de cribado masivo, conocidas como –ómicas, ha permitido aumentar enormemente el rendimiento en el análisis de biomoléculas. Con ello se ha fomentado la aparición y posterior desarrollo de campos de investigación como la genómica, la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica lo cual ha facilitado de forma sustancial el descubrimiento de nuevos biomarcadores. Cada uno de estos campos estudia el estado de un sistema biológico a distintos niveles, siendo la proteómica y la metabolómica las más cercanas al fenotipo del sistema estudiado. Gracias a las técnicas de alto rendimiento se ha consolidado el concepto de análisis “libre de hipótesis” en el que se comparan miles de analitos entre muestras muy bien fenotipadas y los datos generados de forma masiva son interpretados a posteriori.

A pesar del gran rendimiento analítico que aportan las técnicas –ómicas hay que resaltar que el proceso que conduce desde el descubrimiento de un nuevo biomarcador hasta su validación es largo y extremadamente costoso. Pueden llegar a transcurrir hasta 20-30 años desde la descripción inicial hasta su empleo en la práctica clínica. Por lo general este proceso suele distinguir distintas fases que incluyen el **descubrimiento**, la **confirmación**, la **verificación** y la **validación** (Figura 5), en las cuales se van reduciendo paulatinamente las moléculas candidatas analizadas a la vez que se aumenta el tamaño de las cohortes de pacientes.

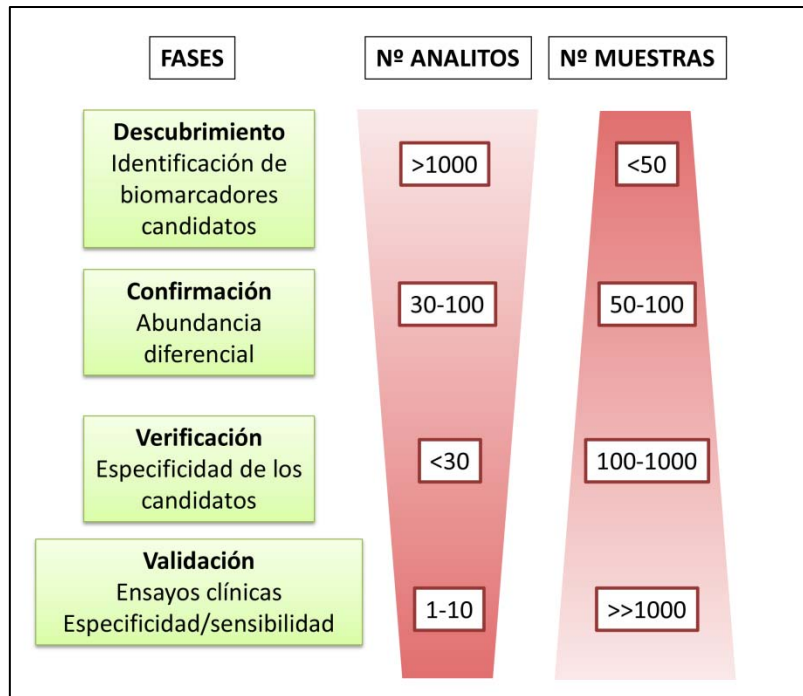


Figura 5: Representación esquemática de las distintas fases en el descubrimiento y validación de un nuevo biomarcador.

Adaptado de "Manual de proteómica, Sociedad Española de Proteómica"

- Fase de **descubrimiento**: en esta fase inicial se comparan un número reducido de muestras que reflejan de forma sumamente precisa la patología bajo estudio, minimizando de ese modo la presencia de posibles sesgos y confusores. El resultado de estos análisis suele reportar un gran número de biomarcadores candidatos entre los cuales hay abundantes falsos positivos, por lo que deberán filtrarse y validarse en posteriores etapas.
- Fase de **confirmación**: se busca establecer una asociación clara entre las moléculas candidatas y la enfermedad estudiada. Para ello se emplean técnicas analíticas distintas a las utilizadas en la fase anterior que aporten una mayor exactitud y permitan una mejor cuantificación. En esta fase se evalúan parámetros como la sensibilidad y la especificidad.
- Fase de **verificación**: se realiza un estudio en cohortes multicéntricas de cientos de pacientes que reflejen la variabilidad biológica intrínseca de las moléculas analizadas en una población heterogénea. En esta fase se pretende confirmar la sensibilidad y la especificidad.
- Fase de **validación**: se evalúan los biomarcadores candidatos mediante técnicas optimizadas en poblaciones muy amplias (de varios miles de pacientes) que permitan realizar el ensayo clínico previo a su implantación o comercialización.

4.2 Biomarcadores para el diagnóstico del ictus

Como se refleja en el apartado anterior, tras las primeras fases de descubrimiento y confirmación un gran número de candidatos no supera las fases posteriores de su desarrollo. La razón más importante que explica esta reducción drástica es que muchos candidatos no muestran utilidad o aplicabilidad en el contexto clínico para el que se pretenden implementar.

4.2.1 Propiedades de los biomarcadores diagnósticos en el ictus

Para que un biomarcador pueda ser usado para el diagnóstico del ictus debe distinguir entre el ictus de naturaleza isquémica y hemorrágica, y a su vez permitir la diferenciación de otras patologías con sintomatología similar (*mimics*). Todo ello, debe ser posible dentro del período de tiempo que constituye la ventana terapéutica con tal de permitir la prescripción del tratamiento agudo adecuado [57]. Considerando este escenario, la detección y cuantificación de uno o varios biomarcadores que permitan el diagnóstico del ictus debe ser rápida, robusta, con la suficiente sensibilidad/especificidad y, además, automatizable para poder facilitar la estandarización del proceso.

Otra de las principales propiedades que debe poseer un biomarcador útil para el diagnóstico del ictus es que su detección sea posible en muestras biológicas accesibles. El líquido cefalorraquídeo permite analizar directamente los compuestos originados en un órgano tan poco accesible como el cerebro, por lo que ha sido empleado de forma habitual en el estudio de distintas patologías cerebrales como el Alzheimer, el Parkinson y también el ictus. Sin embargo en la fase aguda no resulta el tipo de muestra más adecuado en el que cuantificar biomarcadores diagnósticos en ictus ya que la obtención de líquido cefalorraquídeo requiere tiempo, puede favorecer la aparición de hernias y puede conllevar la exclusión del paciente para recibir el tratamiento trombolítico [58]. Otros biofluidos más accesibles y de rápida obtención, como el suero o el plasma, también permiten el análisis de moléculas derivadas directamente del sistema nervioso central por lo que representan una valiosa fuente de información acerca de distintos procesos neurológicos. Estas características hacen que se considere este tipo de muestra ideal para cuantificar biomarcadores diagnósticos en el ictus.

A pesar de que ningún biomarcador diagnóstico se ha consolidado todavía para el uso clínico diario, algunos candidatos han mostrado resultados muy prometedores en estudios pre-analíticos [59,60]. Algunos, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) [61] o el S100B [62,63] son moléculas específicas del sistema nervioso central cuyas concentraciones plasmáticas reflejan el daño cerebral. Ambas proteínas permiten la diferenciación de los ictus isquémicos y hemorrágicos e incluso la identificación de algunos

mimics. Otros candidatos como por ejemplo la ICAM-1 o VCAM-1 se asocian al daño vascular producido durante la isquemia cerebral o la rotura arterial que precede a una hemorragia. Se han reportado concentraciones circulantes diferenciadas entre pacientes con ictus isquémico y ciertos *mimics* [64,65]. Otros candidatos, como la MMP9 o el D-dímero [63,65–67] han permitido también diferenciar estos dos grupos, reflejando respectivamente un incremento en la inflamación y una alteración en los procesos de trombosis.

4.2.2 Herramientas estadísticas

Generalmente se considera que una condición básica que debe cumplir un nuevo marcador es la significación estadística (definida mediante un valor de p bilateral $<0,05$). Sin embargo, es importante resaltar que la significación estadística no implica trascendencia clínica o utilidad del marcador [68]. De hecho, un biomarcador con una relación débil puede mostrar una asociación estadísticamente significativa en una muestra suficientemente grande o viceversa. Existen una serie de estadísticos que permiten evaluar el valor real de un biomarcador más allá de su relación con la indicación de interés y cuya utilización está adquiriendo una importancia creciente en la investigación médica.

La regresión logística es el método analítico multivariante más empleado para evaluar la capacidad de predecir un evento por parte de una serie de variables o factores. Tras el análisis, a cada una de las variables predictoras se les asigna un coeficiente de probabilidad (OR, *odds ratio*) que es directamente proporcional a su asociación con el evento. Además, puede darse el caso que un factor resulte un predictor independiente (con un p -valor menor de 0,05 considerando un intervalo de confianza del 95%), es decir que su poder predictivo no dependa de la inclusión de otras covariables en el modelo [69]. Normalmente, estas covariables están compuestas por biomarcadores o variables de naturaleza clínica. Hasta la fecha, no existe consenso acerca de ningún modelo predictivo compuesto por variables clínicas que sea útil para el diagnóstico del ictus [68].

A parte de la capacidad de predecir un evento también es necesario explorar si con la aplicación de un biomarcador en el modelo predictivo se mejora la precisión predictiva y la discriminación de los pacientes. El empleo de curvas ROC (*receiver operating characteristic*) permite describir la habilidad de un modelo predictivo para clasificar los “casos” y los “no-casos”. Además, podemos conocer la mejora en la precisión de clasificación de un biomarcador a través de la comparación del área bajo la curva (AUC, *area under the curve*) de modelos que incluyan o no dicho marcador [70]. Pero con la comparación de AUCs entre dos modelos sólo podemos conocer cuál posee una mayor discriminación. Para averiguar si el nuevo modelo

mejora en promedio la predicción de verdaderos eventos (verdaderos positivos) y/o disminuye la predicción de falsos eventos (falsos positivos) se deben emplear test adicionales, como el índice IDI (*Integrated Discrimination Improvement index*) [71].

5. Aplicación de la proteómica para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en el ictus

El espectacular desarrollo que ha experimentado el campo de la proteómica durante las últimas dos décadas ha permitido pasar del análisis cualitativo de un número reducido de proteínas a la posibilidad de caracterizar el proteoma de un sistema biológico. Un buen ejemplo de ello es *Human Proteome Project* (<http://www.thehpp.org/>)(análogo al *Human Genome Project*), un proyecto internacional coordinado en el que se persigue mapear el proteoma completo del ser humano con el objetivo de sentar las bases para el desarrollo de nuevas aplicaciones médicas para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y prevención de distintas patologías. En claro contraste con la genómica, la proteómica permite analizar los componentes activos de las células, estudiar su función biológica, conocer sus distintas modificaciones y analizar sus interacciones. Es decir, conocer el proteoma permite a los investigadores aproximarse un paso más al fenotipo clínico, algo fundamental en la patología neurovascular en la que múltiples genes interaccionan entre ellos dando lugar a un complejo abanico de manifestaciones fenotípicas. Pero a diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas son moléculas con características bioquímicas y biofísicas muy diversas, hecho que dificulta sustancialmente su análisis a gran escala.

El rápido avance que ha experimentado la proteómica no puede entenderse sin la aparición y acelerada evolución de la espectrometría de masas (*MS, mass spectrometry*). Esta técnica analítica de alto rendimiento pasó del análisis de pequeñas moléculas orgánicas a permitir la secuenciación de grandes proteínas de forma más eficiente que los métodos químicos utilizados previamente, convirtiéndose así en base fundamental de este campo de la ciencia. La complementación de las distintas técnicas de ionización y detección basadas en MS junto con otras técnicas de análisis masivo como los ensayos de afinidad, permite profundizar un paso más en el estudio del proteoma propiciando el descubrimiento de nuevos biomarcadores patológicos.

Actualmente existen alrededor de 200 biomarcadores utilizados habitualmente en la práctica clínica. Algunos de ellos, como la proteína 14-3-3 empleada para el diagnóstico de Creutzfeldt-Jakob [72], derivan de estudios basados en técnicas proteómicas. En el campo de la patología

neurovascular han sido numerosos los candidatos que han mostrado resultados positivos tras su descubrimiento mediante proteómica y también en las primeras fases de su desarrollo. Un ejemplo es la Apolipoproteína CIII (APOC-III, *apolipoprotein C-III*), con niveles significativamente diferentes en pacientes que han sufrido un ictus isquémico comparado con los que sufrieron un ictus hemorrágico [73].

5.1 Tipos de muestras

5.1.1 Fluidos biológicos

Existe una gran variedad de muestras que pueden ser utilizadas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en el ictus a través de técnicas proteómicas, de entre las cuales los fluidos biológicos representan la fuente por excelencia. La **sangre** incluyendo sus componentes junto con **el suero o plasma**, es el fluido más utilizado por su gran accesibilidad y su capacidad de reflejar cambios biológicos producidos en el sistema nervioso central.

No obstante, las técnicas proteómicas, especialmente las basadas en MS, muestran algunas limitaciones para el análisis de estos fluidos. La principal de ellas es el amplísimo rango dinámico (de 10 a 12 órdenes de magnitud) que existe entre las concentraciones de las proteínas contenidas en estas muestras. De hecho, el 90% de proteína total del plasma lo representan únicamente las 22 proteínas más abundantes, lo cual supone una dificultad añadida para el estudio de aquellas proteínas de menor abundancia relativa [74].

Otro fluido biológico muy utilizado en la exploración proteómica para el descubrimiento de biomarcadores en el ictus es el **líquido cefalorraquídeo** (CSF; *cerebrospinal fluid*). Aquello que hace este tipo de muestra especialmente atractiva es su secreción directa por parte de las estructuras del sistema nervioso central lo cual lo convierte en un indicador idóneo de las alteraciones de proteínas en el cerebro. De modo similar, el microdializado cerebral permite monitorizar los cambios en la composición del fluido extracelular cerebral al recoger sustancias endógenas del líquido intersticial a través de su difusión por una membrana semipermeable situada en el extremo de una sonda [75]. Sin embargo, las muestras de CSF presentan algunos retos para su análisis proteómico incluyendo también un amplio rango dinámico, una baja concentración de proteína total (0.3-0.7mg/mL) y un volumen relativamente reducido [76,77]. Estas limitaciones técnicas se suman a las limitaciones prácticas ya comentadas en el apartado anterior, que reducen la utilidad de las muestras de CSF en el campo del ictus especialmente desde el punto de vista diagnóstico.

Introducción

La **orina** también ha sido analizada como fuente de marcadores biológicos en distintas patologías, y el ictus no es una excepción. En comparación con la sangre o el CSF, la orina es un fluido abundante, cuya obtención es no-invasiva y con una composición mucho más simple. Su principal limitación es la gran variabilidad que presenta debido a la dieta, a ciertos medicamentos y a afectaciones renales.

Otros fluidos biológicos que han sido utilizados en estudios de proteómica para el descubrimiento de nuevos biomarcadores incluyen la **saliva**, el **líquido bronco-alveolar**, el **líquido sinovial**, **lágrimas**, **fluido mamario** o el **líquido amniótico**. Cabe destacar que la utilidad y/o aplicabilidad de este tipo de muestras aún no han sido probadas en el contexto de la patología neurovascular.

5.1.2 Tejido

A parte de los biofluidos, existen otras fuentes que pueden aportar información biológica relevante y que, a pesar de no ser aplicables en la práctica clínica, representan un importante punto de partida para el descubrimiento de nuevos biomarcadores candidatos. El **tejido cerebral** post-mortem representa una fuente de información valiosísima para el estudio de la expresión global de proteínas en distintas zonas del tejido afectado tras el ictus. Además, mediante técnicas como la microdissección láser, es posible profundizar en el estudio de los distintos **tipos celulares cerebrales** (neuronas, astrocitos, células endoteliales, etc) tras su aislamiento. Esto facilita una aproximación más precisa para el estudio de la respuesta celular específica frente a un estímulo.

Siguiendo esta línea de razonamiento, gracias a la colaboración de distintos centros de investigación, ha sido desarrollada recientemente la base de datos pública *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>). Esta iniciativa recoge de forma sistemática los perfiles de expresión de miles de proteínas analizadas mediante inmunohistoquímica en 44 tejidos humanos incluyendo más de 80 tipos celulares diferentes. Este estudio del proteoma basado en anticuerpos permite conocer la distribución espacial de proteínas y explorar su expresión en los distintos tejidos. Esto supone una importante referencia para la selección de proteínas específicas de tejido y su exploración como biomarcadores diagnósticos de distintas patologías, incluido el ictus [78].

5.1.3 Cultivos celulares

En contraste con los casos anteriores, los **cultivos celulares primarios** o de **líneas inmortalizadas** son modelos más simples y homogéneos que permiten el hallazgo de proteínas y vías de señalización biológicamente relevantes en la respuesta a un estímulo. Tanto las

propias células como también su medio condicionado que contiene el **secretoma** han sido objeto de análisis a través de técnicas proteómicas. Su uso permite el estudio de la respuesta celular específica a estímulos controlados de forma mucho más precisa.

Cada uno de estos tipos de muestra permite el estudio del proteoma a diferentes niveles y pueden aportar una visión complementaria o más profunda de éste. Pero para ahondar en la caracterización del proteoma de un sistema se pueden emplear también una serie de estrategias de preparación de las muestras que repercuten en el número de proteínas detectadas y analizadas [79]. Las técnicas de **depleción** de proteínas abundantes basadas en columnas de intercambio iónico o de afinidad son extremadamente útiles en el análisis de muestras como suero o plasma, ya que facilita el estudio de las proteínas que se hallan en menor concentración. En combinación con éstas o de forma alternativa, pueden utilizarse un gran número de estrategias de fraccionamiento como las **técnicas electroforéticas** (SDS-PAGE, isoelectroenfoque, electroforesis de flujo libre o electroforesis capilar), las **técnicas cromatográficas** (de intercambio iónico, en fase reversa o de exclusión) o incluso el **fraccionamiento subcelular** (centrifugación diferencial, centrifugación en gradientes de densidad o purificación mediante afinidad). Muchas de estas estrategias son útiles para el análisis proteómico a través de MS, pero algunas de ellas también pueden ser utilizadas en análisis basados en ensayos de afinidad. En la Tabla 2 se recogen los distintos tipos de muestra junto con la gran variedad de estrategias empleadas para el estudio del proteoma en aquellos estudios centrados en la búsqueda de nuevos biomarcadores útiles para el diagnóstico del ictus.

5.2 Técnicas proteómicas utilizadas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en ictus

Las plataformas proteómicas conforman un campo de investigación dinámico y que se encuentra en constante evolución. A lo largo de los años se ha pasado de la simple identificación proteica a la cuantificación de las proteínas de una muestra de un modo preciso y con una elevada resolución. Debido a la gran prevalencia y el impacto socio-económico que tiene el ictus, las innovaciones que han surgido en el campo de la proteómica no han tardado en ser aplicadas para mejorar el conocimiento de los procesos biológicos vinculados a esta patología. Todos los estudios realizados, desde los iniciales basados en el uso de geles de electroforesis bidimensional hasta los más recientes empleando los espectrómetros de masas más sensibles, han facilitado la identificación de nuevas vías de señalización, nuevas dianas

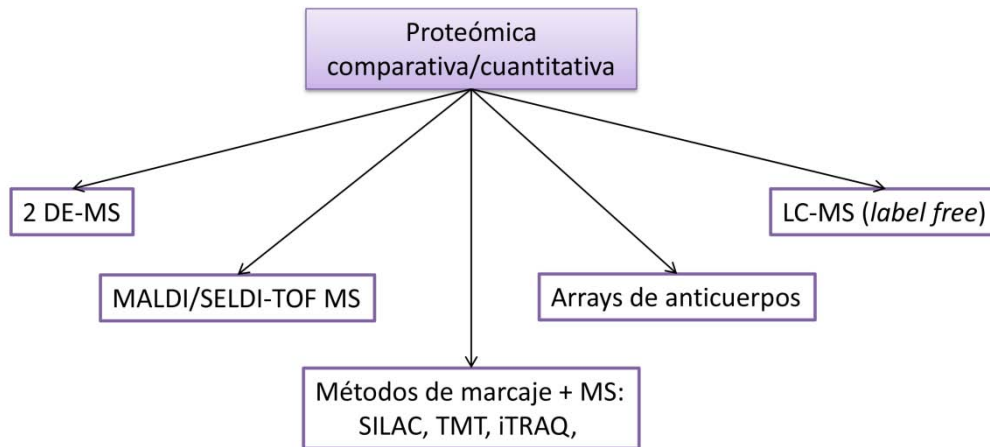


Figura 6: Metodologías proteómicas más utilizadas para el estudio del ictus (adaptado de [107]).

2 DE: electroforesis de 2 dimensiones, iTRAQ: isotope tagging for relative and absolute quantification, LC: cromatografía líquida, MALDI: *Matrix assisted laser desorption ionization*, MS: Espectrometría de masas, SELDI: *Surface enhanced laser desorption ionization*, SILAC: *Stable isotope labeling With Aminoacids in cell culture*, TOF: *Time of flight*, TMT: tandem mass tag.

terapéuticas o nuevos biomarcadores. En la figura 6 se representan de forma esquemática las técnicas proteómicas cuantitativas o semi-cuantitativas más utilizadas en el estudio del ictus.

5.2.1 Proteómica basada en electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional permite simplificar una mezcla compleja de proteínas generalmente a través de una primera separación por isoelectroenfoque (basada en la carga neta) seguida de una segunda separación a través de SDS-PAGE (basada en el peso molecular). Tras las separaciones, las proteínas de la muestra quedan distribuidas a lo largo del gel resultante en forma de puntos o *spots*. La determinación de la abundancia total de proteína en cada *spot* se realiza a través de marcajes con tintes orgánicos, plata o fluorescencia lo que permite la cuantificación relativa entre las distintas muestras comparadas. A continuación se aíslan aquellos *spots* que reportan diferencias significativas y finalmente se lleva a cabo la identificación proteica a través de MS [109].

La proteómica basada en electroforesis bidimensional ha sido la técnica tradicionalmente más utilizada para el descubrimiento de biomarcadores en distintos campos de la biomedicina. Gracias a los requerimientos técnicos relativamente sencillos de la separación bidimensional es posible realizar la fase inicial del proceso en laboratorios no especializados lo cual ha permitido rebajar sustancialmente los costes del análisis. A ello se le suma su robustez y reproducibilidad notables, junto a la posibilidad que ofrece de estudiar de forma sencilla ciertas modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, la proteómica basada en la electroforesis bidimensional

Tabla 2: Estudios de proteómica con el objetivo de encontrar biomarcadores diagnósticos del ictus. Los parámetros de búsqueda utilizados fueron “cerebrovascular disease OR neurovascular disease OR stroke OR ischemia OR ischemic stroke OR hemorrhagic stroke) AND (proteomic OR proteome)”. Se incluyeron aquellos estudios que realizaron al menos una fase para la validación de los resultados.

Muestra	organismo	Plataforma proteómica	Biomarcador	Patología	Ref
Sangre					
Suero	humano	TMT + LC-MS/MS	Platelet Basic protein, Ceruloplasmin, Complement C19 gamma	TIA, <i>mimics</i> , minor stroke	[80]
Suero	humano	Microbeads + MALDI-TOF MS	Paneles de 3-5 péptidos sin identificar	Ictus isquémico, <i>mimics</i> , controles	[81]
Suero	humano	iTRAQ +SCX+ LC-MS/MS	ADAMST13, vWF, S100A7	Ictus isquémico y controles	[82]
Células mononucleares de sangre periférica	humano	UPLC-QTOF-MS	DEFA1, MPO	Ictus y controles	[83]
Plasma	humano	NanoLC-Chip/ITMS	LATS1, LATS2, LRP1	Ictus isquémicos, ictus hemorrágico y lontrolos	[84]
Plasma	humano	LC-MS/MS + SRM	APOC-I, APOC-III, APOA-I, APOA-II	ictus isquémico, ictus hemorrágico y controles	[85]
Plasma	humano	Array anticuerpos Searchlight	S100B, RAGE	Ictus isquémicos e ictus hemorrágico	[86]
Suero	humano	MALDI-TOF-MS	HB- α uHb- β	Ictus isquémico y controles	[87]
Plasma	humano	SELDI-TOF-MS	m/z, 2713.9, 4298.7, and 4361.5 Da, picos m/z no identificados	Ictus y controles	[88]
Plasma	humano	SAX2 + SELDI-MS	m/z: 86894, 43564, 44761	Ictus y controles	[89]
Plasma	humano	SAX2 + 1D-PAGE + NanoLC-ESI-MS/MS	APOC-I, APOC-III	Ictus isquémico, ictus hemorrágico y controles	[73]
Líquido cefalorraquídeo o micro-dializado					
Líquido cefalorraquídeo	humano	LC-ESI-MS/MS (SRM)	S100B, NSE, GFAP, α lnx, MBP, NFM, β syn	Icuts isquémico, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea y controles	[90]
Micro-dializado cerebral	humano	TMT + 1D PAGE + LC-MALDI-TOF/TOF MS	GSTP-1, PRDX1, S100B	Core del infarto, penumbra y región contralateral sana	[75]
Líquido cefalorraquídeo	humano	TMT + LC-MS	GFAP, S100B, PARK7	Pacientes post-mortem y ante-mortem	[91]
Líquido cefalorraquídeo	humano	2-DE + MALDI-TOF-MS	h-FABP	Ictus y controles	[92]
Líquido cefalorraquídeo	humano	2-DE + MALDI-TOF-MS y 2DE+ NanoLC-ESI-MS/MS	CAYP, CAT-D cadena pesada, PARK7, FABA, FABE, GFAP, GSTP-1, NDKA, PDX5, PGHD, PPIA, UCHL-1, UFD1	Pacientes fallecidos (tejido isquémico) y pacientes vivos (control)	[93]
Líquido cefalorraquídeo	rata	SELDI y 2DE + MALDI TOF-MS	transthyretin	tMCAO y controles	[94]
Orina					
Orina *	humano	CE + TOF-MS	Gamma-glutamyltranspeptidase 2, Collagen alpha-1(II) chain	Ictus, TIA y controles	[95]
Cerebro					
Homogeneizado cerebral	rata	2DE + MALDI-TOF/TOF MS y COFRADIC LC-MS/MS	HSP70	tMCAO región del infarto y periinfarto y región contralateral sana	[96]
Homogeneizado cerebral	rata	LC-MS/MS	DRP2, Septin-5, Synaptojanin-1	Ratas sham, tMCAO y ICH	[97]
Homogeneizado cerebral	rata	2DE + LC-MS/MS	MAP2, MAPT-tau	Ratas sometidas a hipoxia y grupo control	[56]
Homogeneizado cerebral	humano	iTRAQ + 2D-LC-MS/MS	VIM, ANXA2, HSP70, ferritin, VDACC1, MBP, ATP5a, UQCRC2, SYN1, ALB, SIRT2	Región infarto y cerebro control	[98]
Homogeneizado cerebral	rata	2DE + LC-MS/MS	Calcineurin A, Coronin-1A y GFAP	pMCAO infarto y región contralateral	[99]
Homogeneizado cerebral	humano	2D DIGE + MALDI-TOF/TOF MS	ATP sintasa Beta, GAPDH, RabGDI, NSF, DRP2, RhoGDI1, Septin5, GANAB, GFAP, actin	Región infarto, periinfarto, contralateral sana y control	[100]

Tabla 2 (continuación)

Homogeneizado cerebral y micro-disección de neuronas y vasos	humano	Array anticuerpos Searchlight	MMP-1, 2, 3, 8, 9, 10, 13, TIMP1 y TIMP2	Infarto y región contralateral sana	[101]
Micro-disección de neuronas y vasos	humano	Array anticuerpos Searchlight	CCL1, CCL2, CCL5 y CCL22	Infarto y región contralateral sana	[102]
Homogeneizado cerebral	rata	2DE + MALDI TOF-MS	DRP2, SPNA-2, HSC70-ps1, Tmod2	Infarto y cerebro sham	[103]
Otros tejidos					
Glándula adrenal, bazo y pituitaria	rata	2DE MALDI-TOF-MS	HSP70, PRX3, STAR, UCH-L1	tMCAO y sham	[104]
In-vitro					
Cultivos primarios de neurona	rata	2DE + MALDI-TOF/TOF MS	GRP78, HSP90 α , ENO1, IP3R1, ATP5 β , DPYSL-3	OGD y normoxia/normoglicemia	[105]
Medio condicionado de células cerebrales endoteliales	humano	PAGE + LC-MS/MS	TSP-I	Condiciones de estrés oxidativo	[106]
Línea celular de neuroblastoma	rata	iTRAQ + SCX + LC-MS/MS	EF2, Annexin1, glud-1	OGD, hipoxia, baja concentración de FBS, normoxia/normoglicemia	[107]
Células endoteliales cerebrales	rata	2DE o iCAT + LC-Q/TOF MS	Tubulin, chaperonin, Cu/Zn-SOD, galectin-1, heat shock cognate protein 70, DEAD box polypeptide-5, thioredoxin, triosephosphate isomerase 1, annexin 1, fibronectin 1, myosin regulatory light chain, nucleoside diphosphate kinase, ribosomal protein S12, transgelin, galectin-1	OGD y posterior reperfusión	[108]

Tabla 2 (continuación)

*se incluyó como único estudio de descubrimiento realizado en orina pero los candidatos identificados no fueron validados.

Alnx: alpha-internexin ; ADAMST13: a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif 13; ALB: albumin; ANXA2: annexin 2; APO: Apolipoprotein; ATP5a: ATP synthase subunit alpha; ATP5b: ATP synthase subunit beta; Bsyn: Beta-synuclein; CALB2: Calbindin 2; CATD: Catechol-2,3-Dioxygenase Membrane Subunit; CAT-D: cathepsin D; CAYP: calcyphosine; CCL: Chemokine C-C motif ligand; CE: Capillary electrophoresis; COFRADIC: COmbined FRActional DIagonal Chromatography; COMT: Catechol-O-methyltransferase; DEFA1: Nuetrophil defensin 1; DIGE: Difference gel electrophoresis; DPYSL3: Dihydropyrimidinase-Like 3; DRP2: Dystrophin related protein 2; EF2: Eukaryotic elongation factor 2; ENO1: alpha enolase 1; ESI: electrospray ionization; FABA: fatty acids-binding protein adipocyte; FABE: fatty acids-binding protein epidermal; FBS: suero bovino fetal; GANAB: Glucosidase, Alpha; Neutral AB; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; GRP78: Glucose-regulated protein 78; GSTP-1: glutathione S-transferase P; HB: hemoglobina; h-FABP: Heart-type fatty acid-binding protein; HSP70: Heat shock protein 70; iCAT: isotope coded affinity tags; IP3R1: Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1; TIMS: thermal ionization mass spectrometry; iTRAQ: Isobaric tag for relative and absolute quantification; LATS1: Serin/treonin-protein quinasa LATS1; LATS2: Serin/treonin-protein quinasa LATS2; LC: cromatografía líquida; LRP1: Low density receptor related protein 1; MALDI: Matrix asisted laser desorption ionization; MAP2: microtubule-associated protein; MAPT-tau: microtubule-associated protein tau; MBP: Myelin Basic Protein; MMP: metaloproteasa de matriz; MPO: Mieloperoxidasa; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; MS: espectrometría de masas; NDKA: nucleoside diphosphate kinase A; NFM: Nerofilamento medio; NSE: Neuron-specific enolase; NSF: N-ethylmaleimide sensitive fusion protein; OGD: oxygen and glucose deprivation; PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis; PARK7: parkinson disease protein 7; PDX5: peroxiredoxin 5; PGHD: prostaglandin D synthase; pMCAO: permanent middle cerebral artery occlusion; PPIA: peptidylpropyl isomerase A; PRDX1: peroxiredoxin 1; PRX3: peroxiredoxin 3; QTOF: cuadrupolo acoplado a TOF; RAGE: Receptor of Advanced Glycation End products; SAX: Strong Anion Exchange; SCX: Strong cation exchange; SELDI: Surface-enhanced laser desorption/ionization; SIRT2: NAD-dependent deacetylase sirtuin-2; SPTAN1: spectrin alpha, non-erythrocytic 1; SRM: Selected reaction monitoring; STAR: Steroidogenic acute regulatory protein; SYN1: Synapsin 1; TIMP: TIMP metalloproteinase inhibitor; tMCAO: transient middle cerebral artery occlusion; Tmod2: Tropomodulin 2; TMT: Tandem Mass Tags; TOF: Time of Flight; TSP-1: Trombospondin-1; UCHL-1: ubiquitin C-terminal hydrolase L1; UFD-1: ubiquitin fusion degradation protein 1; UPLC: Ultraperformance liquif chromatography; UQCRC2: Complex III subunit Core 2; VDAC1: voltage dependent anion channel 1; VIM: vimentin; vWF: von Willebrand factor

también presenta una serie de limitaciones que han hecho que deje de ser la aproximación proteómica de elección. La más importante de ellas es la reducida sensibilidad que presenta en el análisis de proteomas complejos y dinámicos como el de las células eucariotas. A ello contribuye el hecho que las proteínas que se resuelven de forma mayoritaria a través del gel son las más abundantes y solubles, las cuales representan únicamente un porcentaje reducido de la totalidad de las proteínas presentes.

5.2.2 Proteómica basada en *Matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) MS

El desarrollo de la espectrometría de masas basada en MALDI permitió en su día el análisis exhaustivo de macromoléculas como las proteínas, lo cual supuso un gran avance para los campos de la biología molecular y la biotecnología. A fecha de hoy, la técnica MALDI acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) es uno de los instrumentos más empleados en los laboratorios de proteómica. Esta gran implantación también se refleja en el gran número de proyectos de investigación en ictus en los que se aplica esta tecnología (Tabla 2). Como su nombre indica, el análisis de una solución proteica o peptídica a través de MALDI se realiza mediante la aplicación de una matriz cuya composición varía dependiendo de la naturaleza del analito sujeto a estudio. Algunos ejemplos de matriz de uso habitual son el ácido ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) para el análisis de péptidos, o el ácido sinapínico (SA, *sinapinic acid*) indicado para proteínas. La mezcla proteica junto con la matriz se deposita sobre una placa superconductora y, tras su cristalización, ésta se irradia con láser UV en la fuente de ionización. Gracias a la matriz aplicada, se favorece la desorción e ionización de las proteínas o péptidos de la mezcla y su posterior entrada al TOF en el que son separados en función de su relación masa/carga (m/z).

A pesar de ser una técnica implementada en investigación desde hace varias décadas, los continuos avances tecnológicos han facilitado la actualización de los sistemas basados en MALDI MS permitiendo aumentar la sensibilidad y especificidad de los instrumentos, así como la optimización del análisis de distintas biomoléculas como lípidos, metabolitos e incluso ácidos nucleicos [110].

Una de las innovaciones más significativas ha sido el desarrollo de MALDI *imaging* MS [111,112]. Esta potente tecnología permite el análisis de la distribución espacial y la abundancia relativa de centenares de biomoléculas directamente sobre secciones de tejido sin utilizar ningún tipo de marcaje o inmunodetección. Tras depositar el tejido sobre portaobjetos bañados en óxido de indio y estaño se aplica la matriz sobre el preparado. A continuación, el tejido es escaneado por el láser en la fuente de ionización y, finalmente, se obtienen los mapas

de distribución iónica en los que se representan la distribución a lo largo del tejido y la abundancia relativa de las biomoléculas detectadas. Pese a su reciente desarrollo, la técnica MALDI *imaging* se ha utilizado en el estudio de una gran variedad de patologías como el Alzheimer [113], el Parkinson[114], la aterosclerosis [115] e incluso la isquemia cerebral [116,117]. Pero es en el campo de la oncología donde esta variante de MALDI goza de mayor implantación. A través de MALDI *imaging* se han identificado multitud de biomarcadores candidatos de cáncer gastrointestinal, renal o de próstata [118] e incluso se ha considerado su potencial aplicación para el diagnóstico molecular en biopsias en ciertos tipos de tumores.

5.2.3 Proteómica basada en métodos de marcaje

La cuantificación relativa a través de técnicas de marcaje se basa principalmente en el uso de isótopos no radioactivos fácilmente identificables y comparables a través de espectrometría de masas. El marcaje puede realizarse de forma biosintética como en el caso de la técnica SILAC (*Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Cell culture*) [119], o mediante derivatización química directamente sobre el extracto de proteínas mediante las técnicas iCAT (*Isotope Coded Affinity Tag*) [120], iTRAQ (*Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*) [121] o TMT (*Tandem mass tags*) [122].

5.2.3.1 Marcaje biosintético

En un experimento **SILAC** estándar el medio de cultivo se suplementa con isótopos pesados (*heavy*) no radioactivos de aminoácidos esenciales (Leu $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N ; Lys $^{13}\text{C}_6$ o Arg $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$)(Figura 7) y a lo largo de sucesivas divisiones las propias células en cultivo los incorporan

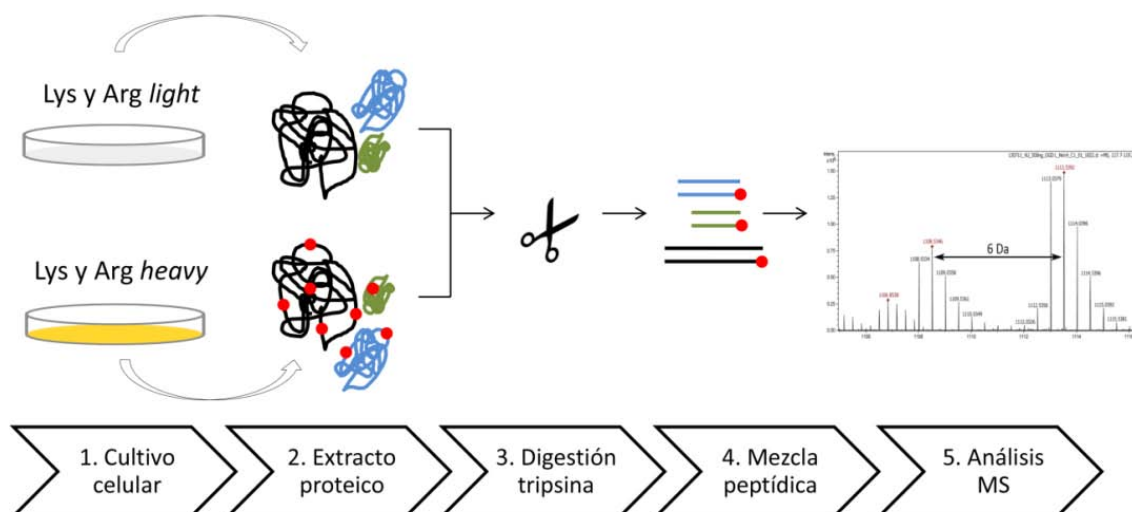


Figura 7. Representación esquemática de los procesos en un experimento de *Stable Isotope Labeling Aminoacids in Cell culture* (SILAC).

Lys: lisina, Arg: arginina, MS: espectrometría de masas.

gradualmente a todo su proteoma. Una vez se han incorporado los aminoácidos *heavy* a la totalidad del proteoma un cultivo se somete a las condiciones experimentales, mientras que un segundo cultivo no marcado (suplementado con aminoácidos *light*) actúa de control. Posteriormente se recogen los extractos proteicos de cada cultivo y se combinan en una mezcla equimolar que pasará a ser digerida por una enzima proteolítica (por ejemplo tripsina). La acción de esta enzima genera péptidos sin marcar procedentes de las células *light* o péptidos con un sólo aminoácido marcado procedentes del cultivo *heavy*. Como resultado, en el espectro de masas se observan parejas de picos (uno *heavy* y otro *light*) cuya intensidad puede ser comparada entre las dos condiciones analizadas.

La técnica SILAC supone una estrategia sencilla, poco costosa, potencialmente aplicable a cualquier tipo de cultivo y adaptable a laboratorios con instalaciones adecuadas para el cultivo celular. De hecho, numerosos estudios han aplicado esta técnica en distintas líneas celulares [119] aunque también se ha logrado el marcaje en cultivos primarios [123], en moscas [124] e incluso en ratones [125].

5.2.3.2 Marcaje a través de derivatización química

Como alternativa al uso de SILAC, existen otras técnicas de marcaje a través de derivatización química. En la cuantificación relativa a través de marcaje **iTRAQ**, cada muestra (hasta ocho) se marca con distintas etiquetas (*tags*) que se unen de forma covalente al extremo amino-terminal de los péptidos a través del grupo reactivo (N-hidroxisuccinimida, NHS). Las muestras se mezclan en un *pool* y se analizan a través de cromatografía líquida acoplada a MS tándem (LC-MS/MS). Cada *tag* posee una masa total idéntica pero que al fragmentarse genera iones reporteros con una masa diferenciable. De esta forma un mismo péptido procedente de ocho muestras distintas generará ocho iones reporteros cuya intensidad puede ser comparada en el espectro MS/MS [121]. De forma análoga a iTRAQ, el marcaje mediante **TMT** sigue el mismo concepto pero con el uso de *tags* ligeramente distintos a los anteriores [122].

En la técnica **iCAT** el grupo reactivo que se añade a cada muestra (*heavy* en una y *light* en la otra) se une específicamente a las cisteínas y gracias al grupo biotina que contiene permite la purificación de los péptidos marcados a través de columnas de afinidad [120].

Existen otras estrategias de marcaje isotópico como por ejemplo la **dimetilación** de péptidos [126] o su marcaje con ^{18}O durante la digestión trípica [127], pero actualmente se encuentran en menor uso debido a su dificultad para analizar múltiples muestras o a su variabilidad en la cuantificación.

5.2.4 *Label free*

La rápida evolución de los instrumentos de MS hacia una mayor sensibilidad y resolución junto con el desarrollo de técnicas de análisis masivo libres de geles ha permitido la consolidación de la técnica de cuantificación por MS *label-free*. La cuantificación *label free* se puede llevar a cabo mediante dos estrategias: i) la medida de la **intensidad de señal de un precursor** en el espectro o ii) el **contaje de espectros** [128].

La cuantificación mediante la medida de la **intensidad de señal** del ión precursor en el espectro, o lo que es lo mismo el área bajo la curva, consiste en medir el área del pico de un péptido en LC-MS, e inferir posteriormente la abundancia de la proteína de la cual procede el péptido [129]. Por otro lado, el **contaje de espectros** se basa en el hecho que un péptido muy abundante en la muestra producirá mayor número de espectros MS/MS, de forma proporcional a la abundancia de la proteína [130].

Ambos métodos de cuantificación poseen limitaciones. Por ejemplo, cuando un péptido co-eluye junto con otros en la cromatografía líquida, su cuantificación mediante el área bajo la curva se vuelve compleja. Por otro lado, distintos péptidos de una misma proteína poseen cualidades físico-químicas diferentes que a veces dificultan su detección a través de MS, lo cual añade un sesgo en cuantificaciones basadas en conteo de espectros [131].

A pesar de poder realizar cuantificaciones con una gran precisión, los métodos de análisis *label-free* son considerados métodos semi-cuantitativos, por lo que es necesaria una validación ortogonal a través de otras técnicas. Las más utilizadas son técnicas basadas en inmunodetección como ELISA, aunque también pueden considerarse otras técnicas basadas en MS como por ejemplo el *Selected Reaction Monitoring* (SRM) o iTRAQ. Esta estrategia ha reportado resultados positivos en distintas patologías como el cáncer de pulmón [132], el cáncer de mama [133], infarto agudo de miocardio [134] y también el ictus [97].

5.2.5 Arrays de afinidad

El análisis proteómico a través de arrays de afinidad no se basa en MS por lo que contrasta claramente con las técnicas anteriores. Un análisis mediante *arrays* de afinidad empieza con la unión a un soporte sólido de una serie de ligandos (generalmente anticuerpos) que reconocen y unen de forma específica una proteína de la muestra. Posteriormente, mediante la aplicación de moléculas reporteras puede realizarse la cuantificación de la proteína [135]. La principal ventaja que ofrecen los arrays de afinidad frente a las técnicas MS es su mayor sensibilidad. Si bien cabe destacar que el análisis de un analito a través de sistemas de afinidad está sujeto a la

Introducción

existencia de ligandos dirigidos a la molécula de interés y cuya especificidad por el analito marcará la calidad de la cuantificación.

Existen multitud de ligandos con distintas propiedades físico-químicas que afectan a su unión con el analito [136]. Los ligandos más ampliamente utilizados son los anticuerpos, ya sean policlonales o monoclonales. A su relativa facilidad de obtención, se le suman su gran afinidad y capacidad de diferenciar distintas isoformas de una misma proteína, o incluso ciertas modificaciones post-traduccionales.

Actualmente, se dispone de distintas plataformas multiplex que permiten el análisis de centenares de proteínas en una misma muestra a través del uso de anticuerpos (p. ej. Luminex o Searchlight). Además, distintos derivados de los anticuerpos han sido sintetizados y utilizados en estudios proteómicos. Un ejemplo son los *single chain variable fragments* (scFv) formados únicamente por la región de unión al antígeno, o los conocidos como *nanobodies*, que contienen una sola cadena pesada.

Pero los ensayos de afinidad no se basan exclusivamente en el uso de inmunoglobulinas. Los aptámeros son cadenas simples de ácidos nucleicos capaces de unirse a proteínas de forma específica gracias a su plegamiento tridimensional [137,138]. Otro ejemplo lo componen las DARPins basadas en repeticiones sintéticas de dominios ankirina de 14-18 kDa capaces de reconocer ciertos patrones estructurales de las proteínas a las que se unen de forma análoga a los anticuerpos [139].

El análisis simultáneo de algunas proteínas puede resultar complejo debido al amplio rango dinámico existente entre las proteínas de muestras como plasma o tejido. Sin embargo, una de las principales ventajas que presenta el análisis proteómico a través de *arrays* de afinidad, es que no se requiere el fraccionamiento de muestras ya que la presencia de proteínas muy abundantes en la muestra no afecta a la unión del ligando con el analito. Esto se traduce en un ahorro en coste y tiempo de análisis [140], además de una mayor robustez y sensibilidad. Cabe destacar que el análisis completo del proteoma a través de *arrays* de afinidad está lejos aún de ser una realidad, y, en general, su mayor aplicación actualmente consiste en el análisis de familias de proteínas o proteínas relacionadas con ciertos procesos fisiopatológicos.

A pesar de que la proteómica basada en *arrays* de afinidad y el análisis a través de MS poseen propiedades distintivas y su aplicación dependerá de las indicaciones del estudio, ambas representan tecnologías complementarias y susceptibles de ser combinadas en el estudio del proteoma. Una clara muestra de ello es la tecnología *Stable Isotope Standards with capture by*

Anti-peptide Antibodies (SISCAPA), mediante la cual se enriquece una mezcla peptídica con la utilización de anticuerpos específicos seguido de la cuantificación a través de MS [141].

2. OBJETIVOS

Objetivo **principal**: Facilitar el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico del ictus mediante nuevas aproximaciones basadas en técnicas proteómicas en modelos experimentales (*in-vitro* e *in-vivo*) y en humanos.

Objetivos específicos:

- Describir el patrón de liberación de proteínas por parte células de la microvasculatura cerebral humana sometidas a privación de oxígeno y glucosa mediante la técnica proteómica SILAC (*Stable isotope Labeling with Aminoacids in Cell culture*).
- Mapear la expresión de proteínas del infarto y la región contralateral sana en cerebro de ratón sometido a isquemia a través de la técnica proteómica MALDI *imaging mass spectrometry*.
- Estudiar la expresión proteica diferencial de distintos componentes de la unidad neurovascular aislados de parénquima cerebral humano a través de proteómica *label-free*.
- Identificar nuevos biomarcadores para distinguir el ictus isquémico y el ictus hemorrágico a través del análisis de los niveles diferenciales de proteína circulante en sangre de pacientes mediante el uso de arrays de anticuerpos.
- Identificar nuevos biomarcadores para distinguir el ictus isquémico y el ictus hemorrágico mediante la integración de herramientas bioinformáticas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

- Cultivos celulares

Células de la línea hCMEC/D3 fueron empleados como modelo *in-vitro* de los elementos endoteliales de la BBB [39] entre los pases 20 y 35. Todos los cultivos fueron mantenidos en placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio EBM (Lonza, España) suplementado al 2% suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) junto con hVEGF, hFGF-b, hidrocortisona, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, GA-100 y heparina, en incubadores a 37 °C, humedad 100%, 5% CO₂ y O₂, hasta su uso. Durante la fase experimental el medio basal de crecimiento fue substituido por medio RPMI 1640 suplementado con 2% FBS dializado (dFBS) junto con los factores de crecimiento anteriores.

- Deprivación de oxígeno y glucosa (OGD, *oxygen and glucose deprivation*):

Los cultivos se sometieron a OGD durante 6 horas en una cámara de hipoxia (INVIVO2 200, Ruskinn, Reino Unido) a 0.5% O₂, 5% CO₂, N₂ y 100% de humedad en medio RPMI1640 sin glucosa. Para la condición de control se mantuvieron los cultivos en incubador y se utilizó medio RPMI 1640 con glucosa.

- Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad:

Para determinar la viabilidad celular tras el tratamiento, células sembradas en placas de 24 pocillos recibieron 500 µL de medio RPMI 1640 con 0,5 mg/mL de MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]. Tras 120 min estas fueron lavadas con PBS y posteriormente lisadas con DMSO. La citotoxicidad del tratamiento se determinó mediante el análisis de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo y corregida por la del lisado celular (Roche Applied Science) mediante lectura espectrofotométrica a 490 nm.

- Animales

Se utilizaron ratones macho adultos de la cepa C57BL/6Ncr1 (8-12 semanas de edad) para llevar a cabo el modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO, *transient middle cerebral artery occlusion*). Tras recibir anestesia (4% isofluorano para la inducción, 2% en aire para el mantenimiento, 79% N₂ : 21% O₂; Abbot Laboratories, España) se realizó una craneotomía seguida de la compresión de la arteria cerebral media (60 min) utilizando una aguja roma (30 G) unida a un micromanipulador. Mediante una sonda Doppler (Moor Instruments, Reino Unido) se certificó un descenso del flujo cerebral <25% durante la oclusión

Material y métodos

seguido de un incremento >75% durante la reperusión. Los animales fueron sacrificados a las 24h bajo anestesia y mediante perfusión cardíaca.

- **Pacientes**

Todos los pacientes incluidos fueron diagnosticados por los equipos de Neurología y Neurorradiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón siguiendo protocolos previamente publicados [86,142]. Los grupos diagnosticados incluyen pacientes con ictus isquémico, pacientes con hemorragia intracerebral y pacientes con patologías mimetizantes, junto con controles sanos.

Suero y plasma

En el momento de la admisión (<6h desde el inicio de los síntomas) se extrajeron muestras de sangre a todos los pacientes antes de recibir ningún tipo de tratamiento. Para obtener el suero, la sangre se dejó coagular mientras que la extracción de plasma se realizó en tubos EDTA. Ambas se centrifugaron a 1500g durante 15 min (4 °C) y se almacenaron a -80 °C hasta ser utilizadas.

Tejido cerebral

Junto al equipo de neuropatólogos, se obtuvieron muestras de tejido cerebral correspondientes a las áreas de infarto y contralateral de pacientes fallecidos tras el episodio isquémico. Posteriormente las muestras empleadas en estudios de proteómica fueron congeladas con nitrógeno líquido (196 °C) y almacenadas a -80 °C, mientras que las utilizadas en técnicas de confirmación fueron fijadas con paraformaldehído.

Técnicas de *discovery*

- **Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Cell culture**

Para el análisis mediante SILAC el medio utilizado fue RPMI 1640, tanto en la fase de crecimiento y marcaje como en la fase experimental. La tabla 3 indica la composición de los distintos medios utilizados en cada fase del experimento. La fase experimental fue replicada realizando un marcaje cruzado en los medios, es decir, el medio *heavy* se utilizó en la condición de control mientras el medio *light* se empleó en la de OGD.

Tras el tratamiento se obtuvieron los medios condicionados de ambos cultivos, se concentraron a través de tubos de filtración Amicon-ultra aplicando un límite de exclusión de 3KDa (Merck Millipore, Alemania) y se suplementaron con inhibidores de proteasas (4.5 µL de aprotinin y 10 µL de fenilmetilsulfonil fluorídico). Los sobrenadantes concentrados obtenidos

de las condiciones control y OGD se mezclaron en proporción 1:1 (p:p) acorde con la concentración total de proteína determinada a través del ensayo RC DC (BioRad, EEUU). Después de su digestión con tripsina, 500 ng de la mezcla de péptidos se analizaron a través de un espectrómetro de masas Maxis Impact Q-TOF (Bruker, Alemania) acoplado a HPLC (Proxeon Biosystems, EEUU). La identificación proteica se realizó mediante el software MASCOT (Matrixscience, Reino Unido) y los péptidos marcados se cuantificaron mediante el software WARP-LC (Bruker).

suplementos	Fase de crecimiento		Fase experimental	
	Medio <i>light</i>	Medio <i>heavy</i>	Control	OGD
hVEGF (0,2%)(v/v)	+	+	-	-
hFGF-b (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
Hidrocortisona (0,02%)(v/v)	+	+	-	-
R3-IGF-1 (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
ácido ascórbico (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
hEGF (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
GA-100 (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
Heparina (0,05%)(v/v)	+	+	-	-
FBS dializado (2%)(v/v)	+	+	-	-
Glucosa (2 g/L)	+	+	+	-
L-glutamina (0.29 g/L)	+	+	+	+
Phenol Red (5 mg/L)	+	+	+	+
L-prolina (200 mg/L)	+	+	+	+
L-lisina <i>light</i> (100 mg/L)	+	-	+	-
L-lisina <i>heavy</i> ([U- ¹³ C ₆]-L-lysine) (100 mg/L)	-	+	-	+
L-arginina <i>light</i> (100 mg/L)	+	-	+	-
L-arginina <i>heavy</i> ([U- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]-L arginine) (100 mg/L)	-	+	-	+

Tabla 3: composición de los medios utilizados en la fase de crecimiento y fase experimental del experimento SILAC. El experimento fue replicado realizando un marcaje cruzado.

- MALDI-imaging

Tras la extracción y congelación de cerebros de ratón en isopentano (-40 °C), se obtuvieron secciones de 10 µm de grosor que fueron cubiertas con matriz (ácido sinapínico 10mg/mL, 50% acetonitrilo y 0.2% ácido tricloroacético). A continuación fueron analizadas mediante UltrafleXtrem MALDI-TOF/TOF. Se definieron las regiones de interés (ROIs, *regions of interest*) sobre el área del infarto y contralateral sana de la corteza cerebral. La distribución espacial de los m/z analizados se obtuvo mediante FlexImagin3.0 y la selección de m/z relevantes se realizó a través de ClinProTools. Se desarrollaron 3 estrategias distintas para la identificación

Material y métodos

proteica tras la obtención de homogeneizados de las ROIs. A) fraccionamiento en geles de Tris-tricina 10-20% (BioRad, EEUU). Tras aislar las bandas de interés, éstas fueron digeridas y analizadas a través de MS/MS. B) fraccionamiento por HPLC (C4) y selección y digestión de las fracciones de interés mediante MS/MS. La espectrometría en tándem se realizó en un espectrómetro LTQ Velos-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Alemania). C) separación de fracciones de interés mediante geles de Tris-tricina 10-20% (BioRad) seguido de la digestión de las bandas de interés y análisis mediante huella peptídica (PMF, *peptide mass fingerprint*) en amaZon-ETD ion trap (IT)(Bruker). Las masas de las proteínas identificadas fueron mapeadas con los m/z detectados tras el análisis MALDI *imaging* mediante la herramienta PeptideMass (Expasy, Suiza).

- Librería de anticuerpos Searchlight

Se analizaron muestras de plasma mediante una librería compuesta de 172 anticuerpos siguiendo una configuración de ELISA *multiplex* (SearchLight, Aushon BioSystems, EEUU) combinados en placas de 96 pocillos. Las proteínas detectadas por los anticuerpos de captura se cuantificaron a través de quimioluminiscencia.

- Label-free

Secciones de cerebro de 12 μm de grosor fueron marcadas con NeuN (Millipore) y lectina UEA-I (Sigma) para visualizar neuronas y elementos endoteliales de la BBB respectivamente. Mediante micro-disección láser (Leica CM3050 S; Leica Microsystems, Alemania) fueron aislados ambos tipos celulares (25000 neuronas i 4000 elementos endoteliales en cada muestra) y posteriormente lisados mediante sonicación en 60 μL 0.1% Rapigest (Waters, España). Tras su digestión triptica las muestras se analizaron en un (LTQ) Orbitrap Velos Pro (Thermo Electron, USA). Cada muestra fue inyectada 4 veces y se siguió una estrategia de *gas phase fractionation* (GPF) utilizando los rangos 400-520, 515-690, 685-979 y 974-2000 m/z para la selección de precursores. La identificación proteica se llevó a cabo mediante Mascot (EEUU) y la cuantificación y comparación estadística entre las distintas regiones de interés se realizó con el software Progenesis LC-MS v4.0 (UK).

- Human Protein atlas

La base de datos Human Protein Atlas V13 fue filtrada mediante la herramienta Excel macro para seleccionar las proteínas específicas de cerebro y células gliales. Las proteínas tabuladas como *Supportive* fueron filtradas siguiendo 3 criterios: i) proteínas con una expresión alta en tejido cerebral y baja o indetectable en otros tejidos, ii) proteínas con expresión media en células gliales e indetectables en otros, iii) proteínas con expresión alta en células gliales e

indetectables en otras. Las proteínas candidatas fueron ordenadas en función de su *Score*, y seleccionadas para su análisis según la disponibilidad de kits comerciales y literatura publicada.

Técnicas de confirmación

- ELISA

Las muestras de plasma o suero obtenidas fueron analizadas mediante ensayos ELISA comerciales. Las muestras fueron diluidas siguiendo las recomendaciones del fabricante o tras establecer la dilución óptima. Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizaron los valores medios para el correspondiente análisis estadístico, considerando sólo aquellos replicados con un CV<20%. Los CV inter-ensayo fueron<20%.

- Western Blot

Los extractos proteicos se separaron en geles SDS-PAGE (10%, 12% y 14%) y se transfirieron a membranas de polivinilo difluorídico (1h a 100V). Tras bloquearlas con leche desnatada (al 10% en PBS tween 0.05%) durante 1h, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios (4 °C, *overnight*, en agitación). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (1h a T ambiente). Finalmente se añadió Luminol (Amershan Biosciences, Reino Unido) a las membranas y se analizaron a través del lector LAS3000 (Fujifilm, EEUU). La señal detectada se cuantificó mediante Image-J.

- Inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 12 µm de grosor a partir de cerebros de ratón que fueron fijados con paraformaldehído e incluidos en OCT. Tras su fijación con acetona, las muestras se sometieron a desenmascaramiento antigénico en ácido cítrico (pH=6, T=95°C) y posteriormente se bloquearon con suero de cabra (5% en PBS tween 0,1%). A continuación se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, el secundario conjugado con biotina y seguido a su vez de streptavidina conjugada con enzima peroxidasa. Finalmente se incubaron las muestras con diaminobencidina (DAB) (Dako, Dinamarca).

- Inmunofluorescencia

Se obtuvieron secciones de cerebro humano de 12 µm de grosor correspondientes a las regiones de infarto y contralateral que fueron fijadas en paraformaldehído y embebidas en parafina. Las muestras fueron tratadas siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior. Para la detección de vasos se empleó lectina (1:10 en PBS-tween 0.1%, 1 h, T ambiente en oscuridad) mientras que las neuronas se detectaron mediante NeuN (1:100, *overnight*, 4 °C). Tras la incubación con el anticuerpo secundario las muestras se incubaron en

Material y métodos

Negro Sudán (10 min, T ambiente, en oscuridad). Finalmente las muestras se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol para el marcaje de los núcleos celulares.

Estadística

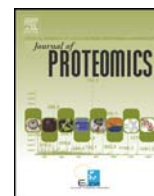
Las variables continuas fueron analizadas mediante el test t de Student y ANOVA (variables con distribución normal) o mediante Mann-Whitney o Kruskal-Wallis (variables con distribución no-normal) utilizando el software SPSS (versión 15, IBM, EEUU). En todos los casos se consideró significativo un p-valor<0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

Para los biomarcadores candidatos, se desarrollaron los modelos predictivos a través de regresión logística, indicando los *odds ratio* (OR) considerando un intervalo de confianza de 95%, para cada variable. La precisión de los modelos se analizó mediante comparación del AUC a través del método DeLong [143], utilizando el software MedCalc (version 12.4, Bélgica). El índice IDI se calculó a través de R para cada modelo ((Hmisc and PredictABEL packages; R Development Core Team 2012, Austria) [71,144]).

4. COPIA DE PUBLICACIONES

1) Characterization of secretomes from a human blood brain barrier endothelial cells in-vitro model after ischemia by stable isotope labeling with aminoacids in cell culture (SILAC).

(J Proteomics. 2015 Dec 21. pii: S1874-3919(15)30216-5. doi: 10.1016/j.jprot.2015.12.011.)



Characterization of secretomes from a human blood brain barrier endothelial cells in-vitro model after ischemia by stable isotope labeling with aminoacids in cell culture (SILAC)



Victor Llombart^a, Teresa García-Berrocóso^a, Joan Josep Bech-Serra^b, Alba Simats^a, Alejandro Bustamante^a, Dolors Giralt^a, Gemma Reverter-Branchat^b, Francesc Canals^b, Mar Hernández-Guillamon^a, Joan Montaner^{a,*}

^a Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Proteomics Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2015

Received in revised form 4 December 2015

Accepted 17 December 2015

Available online 21 December 2015

Keywords:

Secretome

Silac

Endothelial cells

Ischemic stroke

Biomarkers

Cerebral ischemia

Blood-brain-barrier

ABSTRACT

The human immortalized brain endothelial cell line hCMEC/D3 is considered a simple in-vitro model of the blood–brain–barrier. Our aim was to characterize changes in the secretome of hCMEC/D3 subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) to identify new proteins altered after ischemia and that might trigger blood–brain–barrier disruption and test their potential as blood biomarkers for ischemic stroke. Using a quantitative proteomic approach based on SILAC, 19 proteins were found differentially secreted between OGD and normoxia/normoglycemia conditions. Among the OGD-secreted proteins, protein folding was the main molecular function identified and for the main canonical pathways there was an enrichment in epithelial adherens junctions and aldosterone signaling. Western blot was used to verify the MS results in a set of 9 differentially secreted proteins and 5 of these were analyzed in serum samples of 38 ischemic stroke patients, 18 stroke-mimicking conditions and 18 healthy controls.

Significance: “We characterized changes in the secretome of hCMEC/D3 cells after an ischemic insult by SILAC and identified proteins associated with ischemia that might be involved in the disruption of the blood–brain barrier. Besides we analyzed the putative potential of the candidate proteins to become biomarkers for the diagnosis of ischemic stroke.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The neurovascular unit is comprised by pericytes, astrocytes, neurons, glial cells and brain microvascular endothelial cells [1], all working together with synchronicity and reciprocity to control brain hemostasis [2]. Within this neurovascular unit, the capillary endothelial cells together with the basement membrane (composed by extracellular matrix proteins, pericytes and astrocyte end-feet) constitute the blood–brain barrier (BBB) [3]. Within these several anatomical layers that exist between the blood and the brain, endothelial cells are the components of the BBB that line at the luminal side of the vessels [1,4] and are

considered the main responsible to control, directly or indirectly, the BBB permeability [2].

Ischemic stroke, caused by the disruption of the blood flow to the brain due to a clot formation, represents one of the most important neurological disorders [5]. During ischemic stroke the BBB increases its permeability and may become disrupted mainly due to the action of matrix metalloproteinases (MMP) and cyclooxygenases (COX), as well as nitric oxide, free radicals and reactive oxygen species that degrade the basal lamina and tight junctions between endothelial cells [6,7]. The integrity loss of the BBB leads to vasogenic edema and it is thought to be involved in the appearance of hemorrhagic transformation, one of the most feared complications of ischemic stroke [8].

Nowadays, stroke diagnosis is mainly based on brain imaging [9] which allows the differentiation of stroke and other stroke-mimicking conditions that resemble the symptoms of brain ischemia but with no arterial occlusion. A rapid and accurate diagnosis of ischemic stroke is essential to administrate thrombolytic treatment [10,11] aiming to dissolve the clot. In that sense, pre-hospital acute stroke treatment is becoming a reality, although its implementation is still limited due to the high resource requirements for advanced technology elements, such as portable CT-scanners [12]. The use of biomarkers might help

* Corresponding author at: Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail addresses: victor.llombart.sebastia@vhir.org (V. Llombart), teresa.garcib@gmail.com (T. García-Berrocóso), joanjospebech@gmail.com (J.J. Bech-Serra), alba.simats@vhir.org (A. Simats), alebustamantangel@gmail.com (A. Bustamante), dolors1985@gmail.com (D. Giralt), greverter@imim.es (G. Reverter-Branchat), fcanals@vhio.net (F. Canals), marguillamon@gmail.com (M. Hernández-Guillamon), 31862jmv@comb.es (J. Montaner).

to speed-up the process of diagnosis, shortening the initiation of the reperfusion treatment and increasing the number of patients that could benefit. That might also reduce costs, compared to the acquisition of neuroimaging equipped ambulances in the pre-hospital settings.

The immortalized brain endothelial cell line hCMEC/D3 has been proven to maintain most of the specific structural, biochemical and functional properties of the brain endothelium in-vitro [13]. Moreover, these cells maintain the capacity to form capillary like networks and the expression of adhesion molecules such as ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1; endothelial markers and chemokine receptors. hCMEC/D3 cells also express components of the BBB such as tight junction associated protein ZO-1 or the integral membrane protein JAM-A, as well as certain claudins and occludins [13–15]. All these characteristics of the hCMEC/D3 cell line suggest that it is a promising, reliable and simple BBB endothelial cells in-vitro model.

[16,17].

Oxygen and glucose deprivation (OGD) has been widely used in cell and organotypic cultures as an in-vitro model of ischemia [18,19]. It has been shown that the permeability across hCMEC/D3 monolayer gets affected after exposure to OGD conditions, showing a substantial increase mainly through nitric oxide synthase induction [19,20].

In our study we aimed to characterize the secretome of hCMEC/D3 cells subjected to OGD. As a secondary aim, we wanted to test the potential of the identified proteins involved in ischemia and maybe in BBB disruption to become diagnostic biomarkers of cerebral ischemia.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

2.1.1. Cells

The cerebral human microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3) was provided by Dr. Couraud, Cochin Institute, France [13]. Cells were maintained in Endothelial Basal Medium (Lonza, Barcelona, Spain) and supplemented with 1/2 of the vial volume of the following specific growing factors: hVEGF, hFGF-b, hydrocortisone, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, GA-100, heparin (Lonza) and 2% fetal bovine serum; and maintained at 37 °C in an humidified incubator with 5% CO₂ and atmospheric oxygen. All cells used in this study were used between pass 20 and pass 35.

2.1.2. SILAC media

For SILAC approach, two different media were used depending on experiment requirements. During cell labeling phase, light and heavy media consisted in SILAC RPMI 1640-Flex (Invitrogen, USA) without arginine or lysine, and supplemented with 2% dialyzed fetal bovine serum (dFBS) (Invitrogen), 2 g/L glucose (Invitrogen), 0.29 g/L L-glutamine (Invitrogen), 5 mg/L Phenol Red (Invitrogen), 200 mg/L L-proline (Sigma, USA), and with 1/2 of the vial volume of the previously specified growing factors. Light growth medium was additionally supplemented with 100 mg/L L-lysine (Invitrogen), 100 mg/L L-arginine (Invitrogen), whereas heavy growth medium was supplemented with 100 mg/L heavy lysine ([U-¹³C₆]-L-lysine (Invitrogen)) and 100 mg/L heavy arginine ([U-¹³C₆,¹⁵N₄]-L-arginine (SILANTES, Germany)).

For SILAC based secretome analysis, media used in OGD experiments consisted in SILAC RPMI 1640-Flex (Invitrogen), supplemented with heavy lysine and heavy arginine, and without dFBS, glucose or growing factors. In addition, OGD medium was deoxygenated prior to use by incubation in 0.5% O₂, 5% CO₂, N₂ and 100% humidity for 24 h. Concomitantly, media used for normoxia/normoglycemia conditions were depleted of growing factors and dFBS but included glucose, light lysine and light arginine.

2.1.3. Media for cell cultures in the replication phase

Growth media used for replication in independent cell cultures consisted in RPMI1640 (Sigma) supplemented with 2% fetal bovine

serum (FBS) (Invitrogen), 0.29 g/L L-glutamine (Invitrogen), 5 mg/L Phenol Red (Invitrogen), 200 mg/L L-proline (Sigma), and with 1/2 of the vial volume of the previously specified growing factors.

The media used for OGD experiments consisted in RPMI 1640 without glucose (Lonza), and without FBS and growing factors. In addition, OGD medium was deprived of oxygen for 24 h prior to use. In contrast, the media used for normoxia/normoglycemia conditions were RPMI 1640 (Sigma), supplemented with 2 g/L glucose and free of serum and growing factors.

2.2. hCMEC/D3 secretome analysis

2.2.1. SILAC cell culture

Fig. 1 schematically represents the experimental procedure. Initially, hCMEC/D3 were seeded separately in 2 subcultures, one in light medium and the other one in heavy medium and grown at 37 °C, 21% O₂, 100% humidity. During the adaptation phase cells were successively passed when 90% of confluence was reached. To check proteome labeling, cells were washed twice with PBS and cell lysate was obtained using RIPA buffer (Sigma). A total of 10 µg of protein were loaded and fractionated into a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and, after staining of the gel with Coomassie G250 (BioRad, USA), one band was cut and digested with trypsin (Promega, USA) for MS/MS analysis. The percentage of labeling of the detected peptides was calculated by the formula $100 * (1 / (1 + L/H))$ (were L/H is the ratio light/heavy).

Once heavy labeling was >90% in more than 85% of peptides, both cell subcultures were seeded in 15 cm Petri dishes with a density of 100,000 cells/mL. Once cells reached 90% of confluence (6.5×10^4 cells/cm²), cultures were washed five times with PBS and kept with heavy or light media without dFBS for 16 h. Cell confluence was not affected during the starvation process. Serum deprivation is recommended in order to reduce the signaling levels in cells to a basal level, and to avoid serum interferences in the posterior MS/MS analysis [21].

2.2.2. Oxygen and glucose deprivation (OGD)

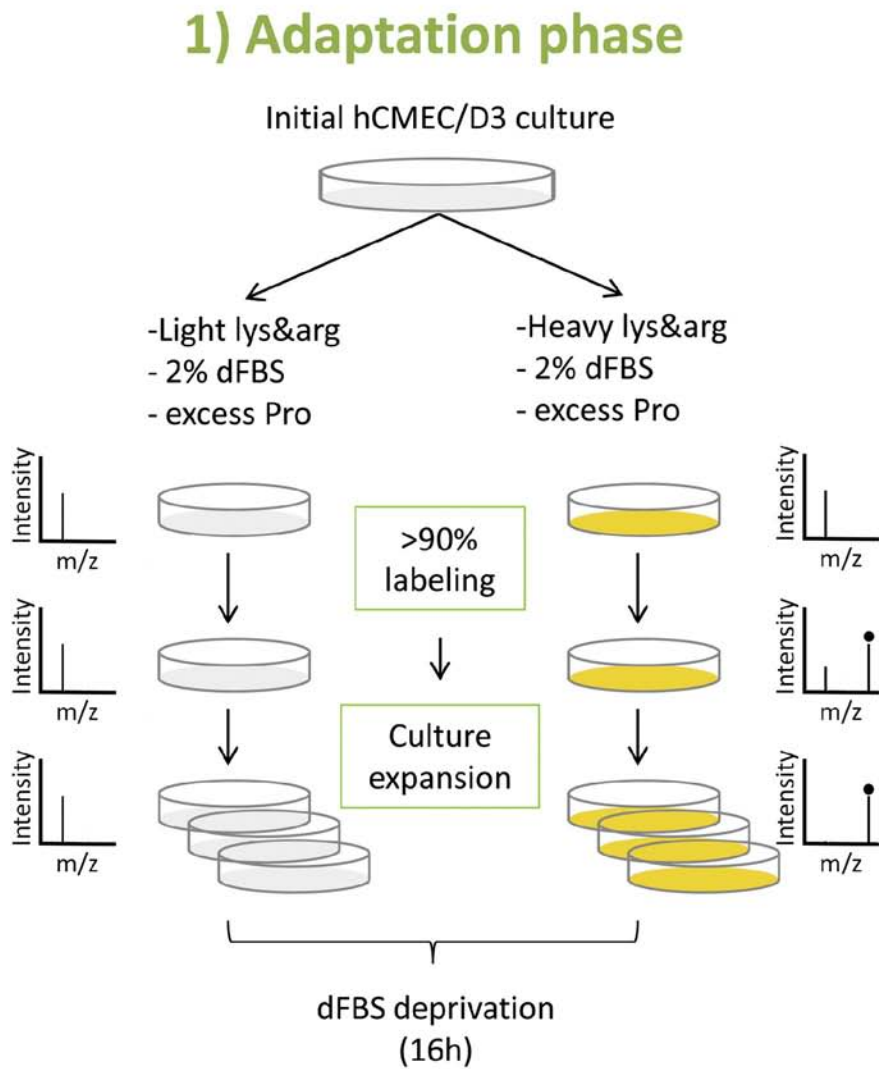
After dFBS deprivation period, each subculture was washed twice with PBS and one time with the corresponding (heavy or light) serum-free medium. Heavy subculture was subjected to OGD treatment for 6 h with OGD medium in an hypoxic chamber (INVIVO2 200, Ruskinn UK) with 0.5% O₂, 5% CO₂, N₂ and 100% humidity, whereas light subculture was kept under normoxia/normoglycemia for 6 h as a control condition. Experiments to obtain media from both cell culture conditions were done twice exchanging light and heavy media (cross-labeling replicates, Experiments E1 and E2).

2.2.3. Cell viability assay

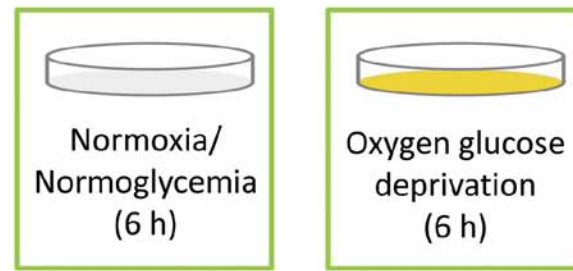
To assess cell viability after treatment MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) assay was performed. Cells were seeded in 24-well plates with a density of 37,500 cells/mL with 500 µL of the corresponding medium, were grown concurrently with cultures used, and were managed equally. After the treatment, cells were washed three times with PBS and MTT was added at a concentration of 0.5 mg/mL in RPMI1640 medium. Cells were incubated at 37 °C, 21% O₂, 100% humidity for 120 min and washed with PBS. Finally, cells were lysed by adding DMSO and the absorbance at 590 nm was measured in an ELX800 microplate reader (Universal Microplate Readers, Bio-Tek Instruments, USA). Cell viability was expressed as the percentage of viable cells compared to normoxia/normoglycemia for each experiment.

2.2.4. Cytotoxicity assay

A cytotoxicity assay was performed based on lactate dehydrogenase (LDH) release, as previously reported [20]. Briefly, LDH released from damaged cells was used to determine cell cytotoxicity. LDH activity was analyzed in culture media and culture lysates following the



2) Experimental phase



Supernatant concentration

Mix 1:1

Trypsin digestion

nanoLC-MS/MS analysis

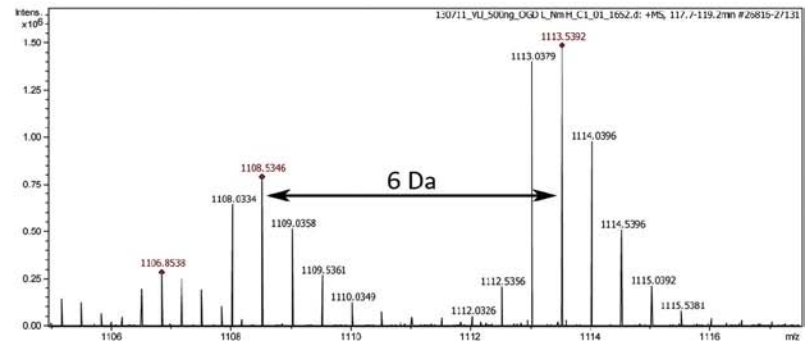


Fig. 1. Diagram of the experimental workflow followed for the analysis of hCMEC/D3 cells secretome by SILAC. Two biological replicates were performed with cross-labeling. dFBS: dialyzed fetal bovine serum.

manufacturer's instructions (Roche Applied Science) by spectrophotometric measurements at 490 nm. LDH released after cell membrane permeabilization or cell lysis was measured as the LDH supernatant activity corrected by the LDH activity in the corresponding cell lysate.

2.2.5. Cell supernatant

After OGD or normoxia/normoglycemia incubation, supernatants were collected on 50 mL Falcon tubes and centrifuged at 1500 g for 5 min at 4 °C to eliminate cellular debris. The supernatant was recovered and concentrated using Amicon ultra-15 filtration (3 kDa molecular weight cut-off) devices (Merck Millipore, Germany) by centrifugation for 40 min at 5000 g followed by a second concentration step using Amicon ultra-0.5 centrifugal devices ((3 kDa molecular weight cut-off) by centrifugation at 14,000 g for 30 min. Samples were kept at 4 °C during the process to avoid protein degradation. Finally, 4.5 µL of aprotinin (Sigma) and 10 µL of phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) were added to supernatant concentrates and kept at –80 °C until use.

2.2.6. LC- MS/MS analysis

Concentrated supernatants were quantified with the RC DC protein assay (Biorad) prior to MS analysis. Within each experiment, equal amounts of light/heavy secretomes were mixed 1:1 (w:w) according to the quantification. The two mixtures (i.e. Experiments E1 & E2) were adjusted to a concentration of 5 µg/µL with 6 M urea and 50 mM ammonium bicarbonate. After adjusting the pH to 8–8.5, DTT was added at a concentration of 10 mM (1 h at room temperature). A total of 30 mM of iodoacetamide were added into the solution as alkylating agent (30 min at room temperature, protected from light). Afterward iodoacetamide was quenched by adding N-acetyl-cysteine and urea concentration was lowered to 1 M by adding 50 mM of ammonium bicarbonate. Finally, samples were digested with 2 µL of trypsin (Promega) overnight at 37 °C and the reaction was stopped by addition of 0.5% formic acid. The tryptic digests were kept at –20 °C until analysis. A total of 500 ng of each digest were analyzed on a Maxis Impact Q-TOF spectrometer (Bruker, Germany), coupled to a nano-HPLC system (Proxeon Biosystems, USA). The peptide mixtures, dissolved in 5% acetonitrile, 0.1% formic acid in water, were first concentrated on a 100 µm ID, 2 cm nanotrapping column (Proxeon Biosystem) and then loaded into a 75 µm ID, 25 cm Acclaim PepMap nanoseparation column (Thermo Scientific, USA). Chromatography was run using a 0.1% formic acid–acetonitrile gradient (2–30% in 180 min for total supernatant digests; flow rate 300 nL/min). The column was coupled to the mass spectrometer inlet through a Captive Spray ionization source (Bruker). MS acquisition was set to cycles of MS (2 Hz), followed by MS/MS (2–20 Hz) of the 20 most intense precursor ions with an intensity threshold for fragmentation of 2500 counts and using a dynamic exclusion time of 0.32 min. All spectra were acquired on the range 130–2200 Da. LC–MS/MS data were analyzed using Data Analysis 4.2 software (Bruker). The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [22] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD002292 and 10.6019/PXD002292.

2.2.7. Protein identification and quantification

Proteins were identified using Mascot (Matrix Science, UK). MS/MS spectra were searched against the Swissprot database (version 2012.06), setting the taxonomy to *Homo sapiens* (40,624 sequences). The search parameters were: precursor mass tolerance of 10 ppm, fragment tolerance of 0.05 Da, trypsin specificity with a maximum of 2 missed cleavages, cysteine carbamidomethylation set as fixed modification and methionine oxidation as variable modification. Significance threshold for the identifications was set to $p < 0.05$ and false discovery rate (FDR) was estimated by running the searches against a randomized decoy database [23]. Results of the identification step were filtered to proteins with a Mascot identification score greater than 30, to adjust FDR below 1.5%. The peptide identifications of both experiments were

matched and reviewed to make sure that no significant proteins were excluded because of different peptide grouping or different protein assignments based on identical peptides between the two experiments.

Quantification was performed with the WARP-LC software (Bruker). Stable isotope-labeled peptides were identified with a mass shift of +6 Da for lysine and +10 Da for arginine. Relative quantification of normoxia/normoglycemia divided by OGD (light/heavy for E1 and heavy/light for the cross-labeling experiment E2) ratios was performed. MS and MS/MS spectra of the relevant proteins were visually reviewed for protein quantification. The results were normalized against the median assuming that the distribution of the quantified values is centered in 1. Ratios <1 were inversed and a – sign was added in order to indicate the proportion of increment compared to the control condition. Thus, normalized L/H < 0 in E1 and normalized H/L < 0 in E2 indicate a higher protein secretion in OGD condition.

Finally, the obtained quantification values were filtered using an in-house Excel Macro to exclude those proteins that did not fulfilled the following criteria: i) proteins identified and quantified in both experiments, ii) proteins identified with a Mascot Score > 30, iii) proteins quantified with at least 2 peptides and with a coefficient of variation (CV) <30%, and iv) proteins that showed a consistent fold change in both experiments (taking into account the cross-labeling) (i. e. ratio with the same sign in both replicates). The threshold of 30% for the CV (third criterion) was set arbitrarily as a way to filter out quantification artifacts of any origin: i.e. signal overlapping or differential oxidation of methionine.

To select the most relevant proteins we calculated the median absolute deviation of the ratios from both experiments taking into account the non-normal distribution of ratios [24]. Median absolute deviation resulted in 1.2 for E1 and 1.14 for E2. We considered these values as a reference and finally selected a more restrictive cut-off ratio of |1.4|.

2.2.8. Gene ontology and network analysis

Bioinformatics tools STRING (<http://string-db.org/>) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) were used to integrate and interpret the proteomic data derived from the secretome analysis regarding information about biological processes, pathways, networks and diseases that involve the considered proteins. STRING was used for protein–protein interaction network analysis, as well as for the study of the main biological processes, molecular functions and cellular components on the basis of Gene Ontology (GO) [25]. IPA was used to identify the top significant canonical pathways altered by ischemic stimulus ($p < 0.05$, adjusted by FDR), and the main diseases and disorders related to the considered proteins. IPA core analysis workflow was performed filtering by endothelial cells and focusing the analysis on nervous system. In all cases *Homo sapiens* was selected as background. All other settings were used as default. Only proteins that fulfilled our selection criteria were considered for these analyses. For the bioinformatics analyses proteins related to normoxia/normoglycemia or OGD conditions were entered separately.

2.3. Prediction of secretory proteins

Proteins were analyzed by SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and secretome P2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) using default parameters as described previously [26]. Proteins were considered as putatively secreted if: i) a signal peptide was predicted along the protein sequence through SignalP (Dscore cut-off: 0.34) or ii) a signal peptide was absent but their NNscore was above the cut-off 0.5 in SecretomeP analysis. Proteins with a signal peptide are considered to pass by the classical secretion pathway while proteins without signal peptide but with a NNscore >0.5 are considered to be secreted through non-classical secretory pathways.

2.4. Replication phase:

2.4.1. Western blot analysis

Candidates to replicate by Western blot were selected based on fold change, function and previous knowledge of the protein (published or in-house data). Concentrated supernatants of independent cell cultures ($n = 9$), following the same procedure than the cultures used in the SILAC experiment, were used in this experimental phase. Briefly, 3 μg of protein (quantified by Bradford assay [27]) from concentrated supernatants were resolved in 10%, 12% or 14% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Bands were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using a mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) for 1 h at 100 V (1.25 h for proteins >200 kDa). Membranes were blocked with 10% non-fat milk dissolved in 0.05% PBS-Tween for 1 h and then incubated overnight at 4 °C with gentle agitation with the following primary antibodies: rabbit anti-Peroxiredoxin 3 (PRDX3) (1:10,000) (AbFrontiers, Korea), mouse anti-Gelsolin (GELS) (1:200) (Santa Cruz, USA); rabbit anti-Collagen alpha 2(I) chain (COL1A2) (1:200) (NOVUS, USA), mouse anti-Neuroblast differentiation-associated protein AHNK (AHNK) (1:500) (NOVUS), mouse anti-Annexin A1 (ANXA1) (1:1,000) (NOVUS), rabbit anti-Citrate Synthase (CISY) (1:1,000) (Sigma), mouse anti-Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2) (1:200) (Chemicon International, USA), mouse anti-Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) (1:3,000) (NOVUS), mouse anti-Clusterin (CLU) (1:1,000) (BD Pharmingen, USA). Secondary antibodies (Chemicon International) anti-rabbit-horseradish peroxidase from donkey or anti-mouse-horseradish peroxidase from sheep, were diluted 1:1,000 in 10% non-fat milk and incubated 1 h at room temperature with gentle agitation. Three washes with PBS-Tween were performed before and after the incubation with secondary antibodies. The substrate reaction was developed with chemiluminescent reagent Luminol (Amersham Biosciences, UK) and analyzed with LAS-3000 luminescent analyzer (Fujifilm, USA). Scanned Western blot was quantified using Image-J free software.

2.5. Blood biomarker exploration

2.5.1. Individuals and samples

All patients included in the study were admitted to the Emergency Department of Vall d'Hebron University Hospital from 2011 to 2014 with stroke suspicion. From that biobank, a total of 32 patients with acute ischemic stroke and 18 patients with stroke-mimicking conditions were selected for this study. Additionally, 18 subjects were also included as healthy controls.

On admission, all patients (strokes and mimicking conditions) underwent a brain CT scan that was reviewed by an experienced neuro-radiologist who was blind to clinical and biomarker data. The neuroimaging was the gold-standard for the diagnosis of ischemic stroke. The detailed protocol has been previously reported [28]. Moreover, initial neurological severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score. A detailed history of demographic and vascular risk factors was obtained from each individual. To identify potential mechanisms of cerebral infarction, a set of diagnostic tests was performed. With this information, and the neuroimaging data, previously defined etiologic subgroups were determined as described previously [28]. This study was approved by the ethics committee of the hospital, and all individuals or relatives gave informed consent in agreement with the Helsinki declaration.

In all individuals blood was drawn before any treatment was administered (or in healthy controls, once recruited for the study), allowed to clot for 2 h at room temperature and centrifuged at 1500 g for 15 min at 4 °C to obtain serum. Samples were stored at -80 °C until use.

2.5.2. ELISA analysis

Serum samples were used to test by commercial immunoassays circulating ANXA1 (USCN, China), CLU (Biovendor, Czech Republic),

COL1A2 (USCN), IGFBP2 (RDSYSTEMS, USA) and PRDX3 (Biovendor), following manufacturer's instructions. Each sample was assayed twice and the mean value was used for analyses. When duplicates showed a CV higher than 20% in OD measurements, those samples were excluded from the analysis.

2.6. Statistical analyses

Descriptive analyses and comparisons were made using SPSS v15. Distribution of all data was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. Western blot data analysis was performed as follows: normally distributed proteins were analyzed by paired t-test and mean and SD values are given whereas for non-normally distributed proteins Wilcoxon test was used and median and interquartile range (IQR) are reported when OGD and normoxia/normoglycemia conditions were compared. ELISA derived data was analyzed using t-test or ANOVA for normally distributed variables and Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis for non-normally distributed ones. Mean and SD, and median and IQR are reported respectively. Correlations between continuous variables were analyzed by Pearson test for normally, and Spearman for non-normally distributed variables. p values <0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Determination of isotope incorporation

To check the proteome labeling efficiency before starting the experimental phase, we analyzed through mass spectrometry the lysate of cells after growing during 5 passages in heavy medium. After in-gel digestion of cell lysate a peptide heavy labeling >90% was observed in more than 85% of patients. In addition, the representative mass spectrum of the peptide IISNASCTTNCLAPLAK from the protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase shows the absence of arginine-to-proline conversion (Fig. 2).

3.1.1. Cell viability and cytotoxicity

Six hours of OGD induced a reduction of MTT of $24.2 \pm 4.9\%$ in all cell cultures, compared to the cells under normoxia/normoglycemia, considered as a control. The LDH release showed a slight increase after OGD with a trend ($p = 0.08$) (data not shown). Both the cell viability and cytotoxicity assays showed similar results as previously reported [20].

3.1.2. Secretome characterization of hCMEC/D3 cells by SILAC

A total of 727 different proteins were identified in the secretome of hCMEC/D3 cells and were filtered to select the most relevant candidates. A total of 443 proteins were quantified from 1,899 heavy/light peptide pairs in the first experiment (E1) and 620 proteins from 2,798 light/heavy peptide pairs in the second (E2). From all these, 389 proteins were quantified in the secretome of both experiments and 117 proteins were quantified with ≥ 2 peptides, with a CV < 30% among identical peptides, and showed an identification score > 30 (Supplemental Table I). Fig. 3 shows the normalized ratio distribution of the 389 quantified proteins in both experiments. From the 117 quantified proteins following our stricter criteria, 19 proteins were found differentially secreted after OGD treatment, showing a fold change >|1.4| in E1 and E2 (Table 1).

3.1.3. Functional analysis of proteomics data

Gene Ontology (GO) analysis was performed regarding GO terms of molecular function, biological process and cellular component, using the String Database [25] with the 117 proteins that were confidently identified and quantified (Supplemental figure 1). Proteins that after OGD were found under-secreted were involved in glucose metabolism, have enzyme and extracellular matrix binding functions and are localized in extracellular exosomes or in the extracellular region. In contrast,

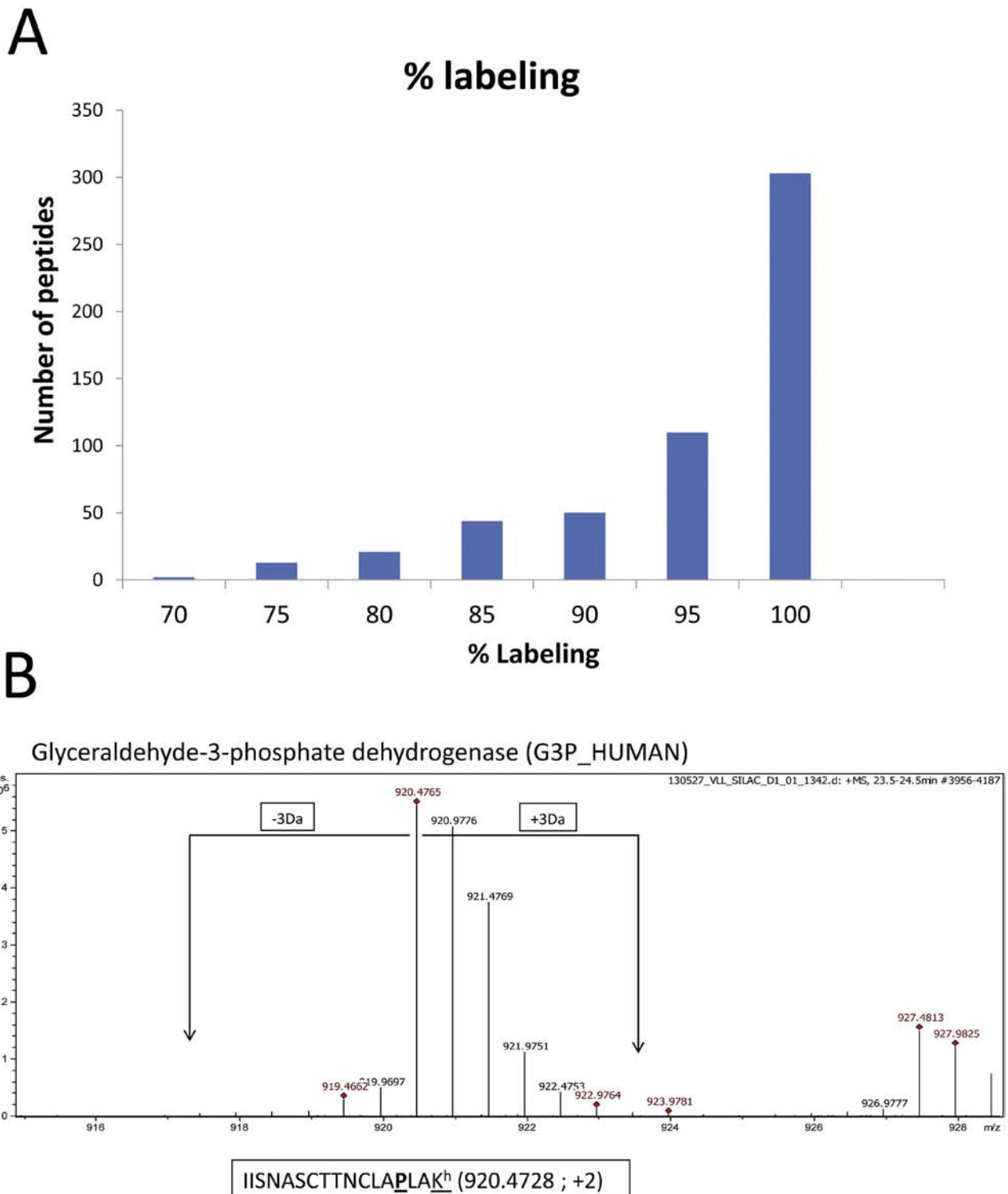


Fig. 2. A) Labeling efficiency analysis through mass spectrometry. After the analysis of cell lysate from cells grown in heavy media, the great majority of quantified peptides showed more than 90% of labeling. B) Representative mass spectrum of the peptide IISNASCTTNCLAPLAK from the protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Peak $m/z = 920.4765$ corresponds to heavy and doubly charged peptide IISNASCTTNCLAPLAK^h from the protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The absence of a peak $m/z = 917.4765$ (shift of -3 Da) corresponding to the light peptide IISNASCTTNCLAPLAK^l indicates complete labeling. The peak $m/z = 923.4765$ (shift of 3 Da) corresponds to the heavy peptide IISNASCTTNCLAPLAK^h, and its absence reflects the absence of arginine-to-proline conversion.

over-secreted proteins are mainly related to protein folding and exhibit nucleic acid binding function. However, these are involved with extracellular exosomes and extracellular regions but also appear as components of the cytosol. In the secretome of both experimental conditions, normoxia/normoglycemia and OGD, proteins of focal adhesion, adherens junctions and anchoring junctions were present in cellular

component GO term. We repeated the GO analysis considering the 19 differentially secreted proteins (fold change $>|1.4|$) (Supplemental figure 2). Proteins under-secreted after OGD showed extracellular matrix binding as principal molecular function, extracellular organization as the main biological process and extracellular matrix as the principal cellular component. In contrast, proteins that were found increased in OGD

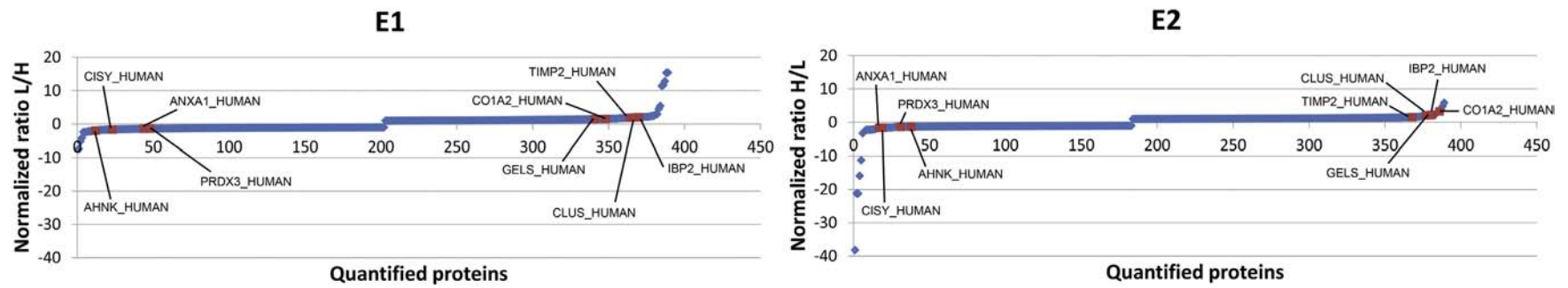


Fig. 3. Distribution of normalized light/heavy (L/H) SILAC ratios (y axis) in E1 and heavy/light (H/L) in E2. A total of 389 proteins that were quantified in E1 and E2 are represented. A positive ratio indicates under-secretion while a negative ratio indicated over-secretion after 6 h of OGD. Those proteins that were selected for the following replication were highlighted in red. Proteins that appear as outliers with the highest ratios in E1 and the lowest in E2, were identified as keratins and considered as contaminants, thus discarded for further replication. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
List of proteins differentially secreted by hCMEC/D3 cells after OGD.

Accession Swiss-prot	Gene name	Protein	Light (normoxia/normoglycemia) vs heavy (OGD)					Heavy (normoxia/normoglycemia) vs light (OGD)				
			Scores ^a	# Peptides ^b	# (L/H) ^c	CV [%](L/H) ^d	Norm L/H ^e	Norm H/L ^e	CV [%](H/L) ^d	# (H/L) ^c	# Peptides ^b	Scores ^a
AN32B_HUMAN	ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	392.7	6	2	11.62	1.57	2.73	22.91	3	4	501.6
ANXA1_HUMAN	ANXA1	Annexin A1	1,426.4	15	7	6.90	-1.42	-1.66	3.49	11	22	1,652.4
PGS1_HUMAN	BGN	Biglycan	544.9	7	5	13.19	2.21	2.26	8.48	4	5	256.9
CISY_HUMAN	CS	Citrate synthase. Mitochondrial	114.8	6	4	5.38	-1.84	-1.75	17.77	2	2	77.6
CLU_HUMAN	CLU	Clusterin	293.4	6	4	11.56	1.95	2.09	6.53	4	7	315.7
COL1A2_HUMAN	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	148.4	5	3	13.64	1.52	3.27	25.56	6	11	585.6
CFAB_HUMAN	CFB	Complement factor B	150.8	2	2	3.44	2.38	1.47	17.73	2	2	91.8
FBLN3_HUMAN	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	3,520.7	35	15	5.71	1.77	2.16	21.48	14	23	2,769.3
FSTL1_HUMAN	FSTL1	Follistatin-related protein 1	818.3	12	7	14.72	1.85	1.41	14.49	6	8	527.2
GELS_HUMAN	GSN	Gelsolin	197.1	5	3	10.03	1.46	2.16	5.96	3	5	170.8
IBP2_HUMAN	IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	474.8	9	5	17.49	2.33	2.23	16.96	5	9	653.8
IBP4_HUMAN	IGFBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	207.5	5	4	16.46	1.6	1.51	18.50	6	9	393.9
IBP7_HUMAN	IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	869.4	12	7	5.79	1.91	1.99	23.84	8	9	439.9
TIMP2_HUMAN	TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	290.3	4	2	4.80	1.87	1.57	26.45	4	5	262.4
AHNC_HUMAN	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	98.5	5	3	27.73	-1.96	-1.49	16.83	13	23	440
SPRC_HUMAN	SPARC	SPARC	941.5	17	10	21.97	2.03	1.86	16.86	6	12	674.8
SMOC1_HUMAN	SMOC1	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	327.6	11	6	4.62	1.61	2.6	8.64	7	10	300.2
PRDX3_HUMAN	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase. Mitochondrial	64.7	4	2	8.54	-1.41	-1.52	17.36	3	4	77.2
UAP1_HUMAN	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	45.1	2	2	29.69	-1.44	-1.46	13.28	4	5	149.5

All proteins of the list were found in the secretome with a fold change >|1.4|, Mascot score > 30, ≥2 peptides and CV < 30% among identical peptides.

^a Indicates Mascot score identification probability.

^b Indicates the number of peptides that have been identified.

^c Indicates the number of peptides that could be quantified and compared between light (L) and heavy (H).

^d Indicates the coefficient of variation of the ratios L/H performed.

^e Indicates the fold change between heavy/light or light/heavy peptides of the corresponding quantification. A negative sign indicates over-secretion in OGD condition.

secretomes showed protein binding, cellular response to reactive oxygen species and mitochondria as the main molecular function, biological process and cellular component, respectively.

The analysis of the 117 proteins through IPA again revealed glycolysis and gluconeogenesis pathways important in normoxia/normoglycemia condition and remodeling of epithelial adherens junctions and aldosterone signaling involved after OGD treatment. Neurological diseases appeared in the top of diseases and disorders category (Supplemental Table II and III).

3.1.4. Annotation of secretory proteins

The 117 proteins were filtered through web-based bioinformatics tools SignalP and SecretomeP to predict which proteins are potentially secreted or found in the secretome as a consequence of cell disruption. A total of 67 proteins (57.3%) were detected as putatively secreted, 50 through non-classical secretory pathways since they showed an NNscore > 0.5 without any signal peptide identified along its amino acid sequence (Supplementary Table IV). From the list of 19 differentially secreted proteins that showed a fold change >|1.4|, 17 proteins (89.4%) were predicted as secreted, 13 of them through the classical secretory pathway (Supplementary Table IV).

3.1.5. Western blot replication

To replicate the findings obtained using the SILAC approach we performed a Western blot analysis in the secretome of new hCMEC/D3 cell cultures (n = 9). We found significantly reduced levels of COL1A2, TIMP2, CLU and IGFBP2 (p < 0.05) after OGD. On the contrary, we found increased concentrations of ANXA1 and PRDX3 (p < 0.05 and p < 0.1, respectively). Thus, these 6 proteins replicated the findings from SILAC proteomics analysis. However, the results from either AHNC or GELS were not replicated and no significant differences between experimental conditions were found.

In addition, CISY was found significantly reduced in the OGD condition, as opposed to the results found in SILAC proteomics (Fig. 4).

3.1.6. Blood biomarker exploration

We finally tried to assess the potential role of COL1A2, CLU, IGFBP2, ANXA1 and PRDX3 as blood biomarkers for ischemic stroke diagnosis. With that purpose the circulating serum levels of these proteins were compared between patients who suffered brain ischemia, patients with other stroke-mimicking conditions and healthy controls. Stroke-mimicking conditions included tumors (11.1%), epilepsy (38.9%), dizziness (11.1%), migraine (5.6%) and others (33.3%) such as dementia, amnesia and confusion. Ischemic stroke patients and mimics were admitted after 5.6 (4.1–6.6) h from symptoms onset. No difference was found among groups regarding prevalence of vascular risk factors (Table 2). While PRDX3 was not detected in either serum or plasma samples, increased circulating levels of COL1A2, CLU and IGFBP2 were found in patients who were hit by ischemic stroke, compared to healthy controls (p < 0.05). When comparing ischemic stroke patients with mimicking conditions, only IGFBP2 showed a trend of increased levels in strokes (p < 0.1) suggesting a potential role of IGFBP2 for the diagnosis of cerebral ischemia (Fig. 5).

4. Discussion

In the present study we characterized for the first time the changes in the secretome profile of the human immortalized brain microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 after an ischemic insult through a high throughput technique based on a SILAC approach. Metabolic labeling based on SILAC minimizes the error of protein quantification when different study groups are considered since the samples combination is performed at early steps of the sample processing, before protein digestion. In contrast, a separate digestion or chemical derivatization are performed in chemical labeling approaches (such as iTRAQ, ICAT,

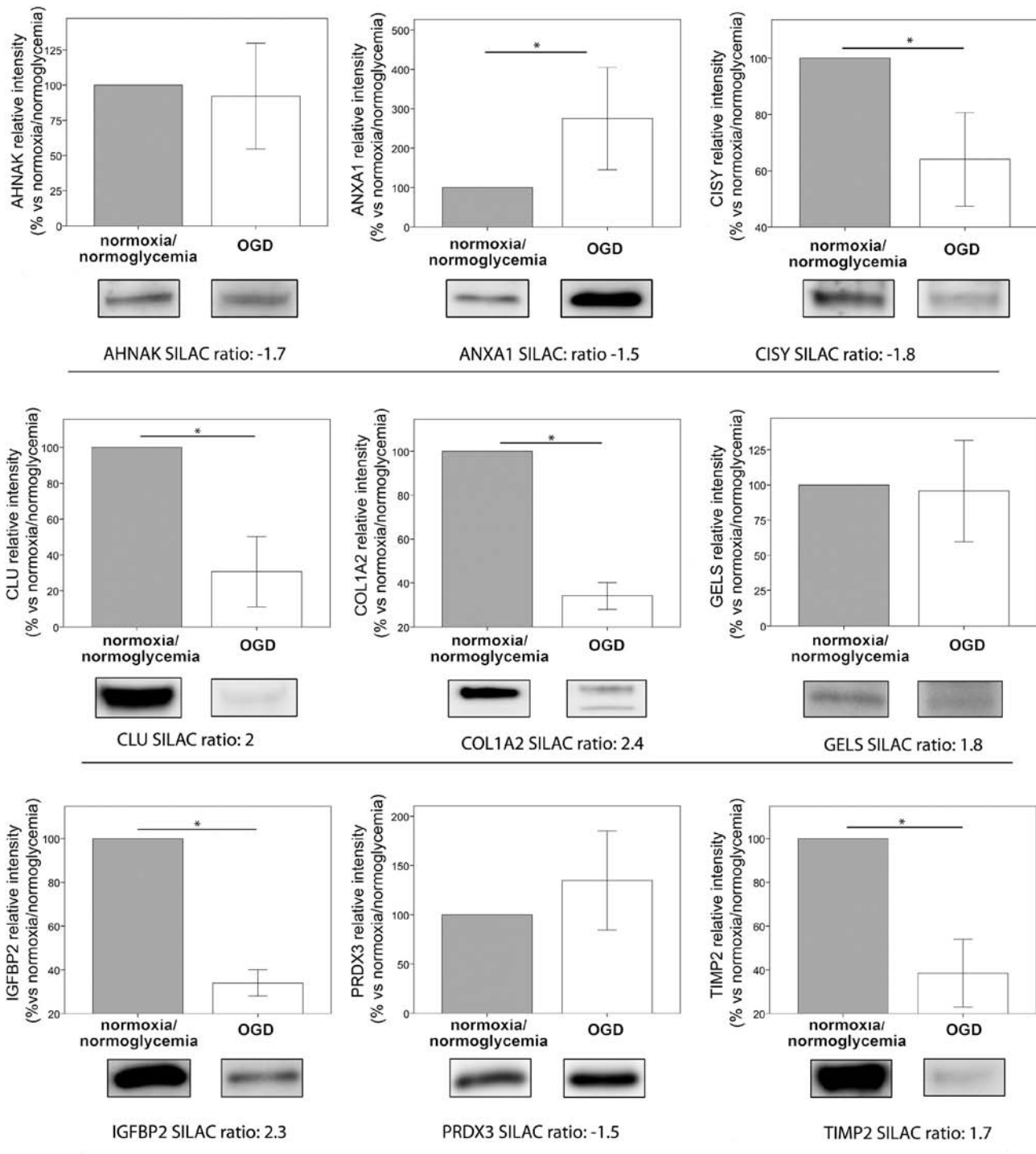


Fig. 4. Western blot replication. SILAC ratio indicates the average ratio of the corresponding protein from E1 and E2. * $p < 0.05$.

TMT), or even separate MS analysis in the case of label-free quantification, which introduces some quantification bias in the relative comparison [29,30]. This strategy allowed us to identify 19 proteins differently secreted by brain endothelium after OGD. Glucose metabolism processes were reduced after OGD as a consequence of glucose starvation, whereas protein folding was increased after ischemic insult. This endoplasmic reticulum biological process represents a cellular response that aims to eliminate unfolded or misfolded proteins, which accumulate during cellular stress, aiming to reestablish homeostasis [31]. Previous studies found altered this process of unfolded protein response in SH-SY5Y neuronal cells after being subjected to OGD [32], and in transient

cerebral ischemia [33,34]. Interestingly, gene ontology analysis of the cellular component revealed that part of the proteins detected in the secretome after OGD are found in the cytosol under normal conditions. Similarly, part of the identified proteins was not predicted to be potentially secreted. The presence of these non-secreted proteins might be a consequence of the release to the media due to cell lysis, as reflected by the increase of LDH activity in supernatant. However, almost all the proteins that showed substantially altered levels after OGD were putatively secreted through classical or non-classical secretion pathways. These results are in line with previous publications since the mechanisms of non-classical secretion have been previously described to be

Table 2

Demographic and clinical factors from ischemic stroke patients, mimicking conditions and healthy controls.

Variable	Ischemic stroke (n = 32)	Mimics (n = 18)	Controls (n = 18)	p
Age (years)	78.72 ± 2.04	73.2 ± 2.75	73 ± 1.34	0.092
NIHSS score at admission	14.19 ± 1.04	–	–	–
Gender (female), n (%)	18 (56.3)	9 (50)	12 (66.7)	0.6
Arterial hypertension, n (%)	22 (71)	9 (47.1)	13 (72.2)	0.19
Diabetes mellitus, n (%)	9 (29)	3 (17.6)	3 (23.1)	0.67
Atrial fibrillation, n (%)	8 (25.8)	3 (17.6)	4 (22.2)	0.81
Cardiac artery disease, n (%)	8 (25.8)	2 (11.8)	1 (7.7)	0.27
TOAST^a				
– Atherothrombotic, n (%)	13 (40.6)	–	–	–
– Cardioembolic, n (%)	6 (18.8)	–	–	–
– Lacunar, n (%)	7 (21.9)	–	–	–
– Undetermined, n (%)	6 (18.8)	–	–	–
Stroke-mimicking conditions				
Tumors	–	2 (11.1)	–	–
Epilepsy	–	7 (38.9)	–	–
Dizziness	–	2 (11.1)	–	–
Migraine	–	1 (5.6)	–	–
others	–	6 (33.3)	–	–

^a Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment (etiological classification). Age and NIHSS at admission are expressed as mean ± SD.

highly regulated by stress condition such as hypoxia or nutrients deprivation [35].

We replicated the differences in the secretion of COL1A2, TIMP2, CLU, IGFBP2, ANXA1 and PRDX3 after OGD by Western blot analysis,

confirming the reliability of our proteomic approach. ANXA1 is a calcium/phospholipid binding protein associated with plasma membrane phospholipids and vesicles [36] and is involved in intracellular trafficking [37], plasma membrane repair [38], apoptosis [39] and leukocyte migration [40]. ANXA1 has been also suggested to exert a protective role in central nervous system after ischemia through the prevention of microglia activation [40,41].

Type I collagen, composed by two $\alpha 1$ chains and one $\alpha 2$ chain (COL1A2) [42,43], is the most abundant and widespread collagen in the body and one of the principal components of the extracellular matrix (ECM). Matrix metalloproteinases become up-regulated during brain ischemia and are essential for ECM rearrangement and play an important role in the BBB breakdown [44]. MMP-1 degrades native type I collagen while MMP-9 and MMP-2 digest collagen fragments [45]. The enhanced action of the MMPs in OGD [46] might explain the substantial decrease in the amount of COL1A2 observed in the secretome of hCMEC/D3 cells after ischemic conditions. Matrix metalloproteinase inhibitors (TIMPs) are also important in the regulation of the ECM rearrangement. Our results are in concordance with previous studies that showed a significant decrease of TIMP-2 levels in hCMEC/D3 supernatant after OGD [47].

CLU is a major secreted glycoprotein [48] that acts as an inhibitor of MMPs [49], thus, together with the decrease of the MMPs inhibitor TIMP2, decreasing of CLU secretion might promote the activation of MMPs during brain ischemia. CLU inhibits the activation and migration of endothelial cells [50] but also plays an important role as an extracellular chaperone, anti-inflammatory molecule and in lipid HDL-associated transport [51,52]. After stroke CLU expression has been reported to be enhanced intracellularly by neurons and glial cells, and secreted by astrocytes [53,54].

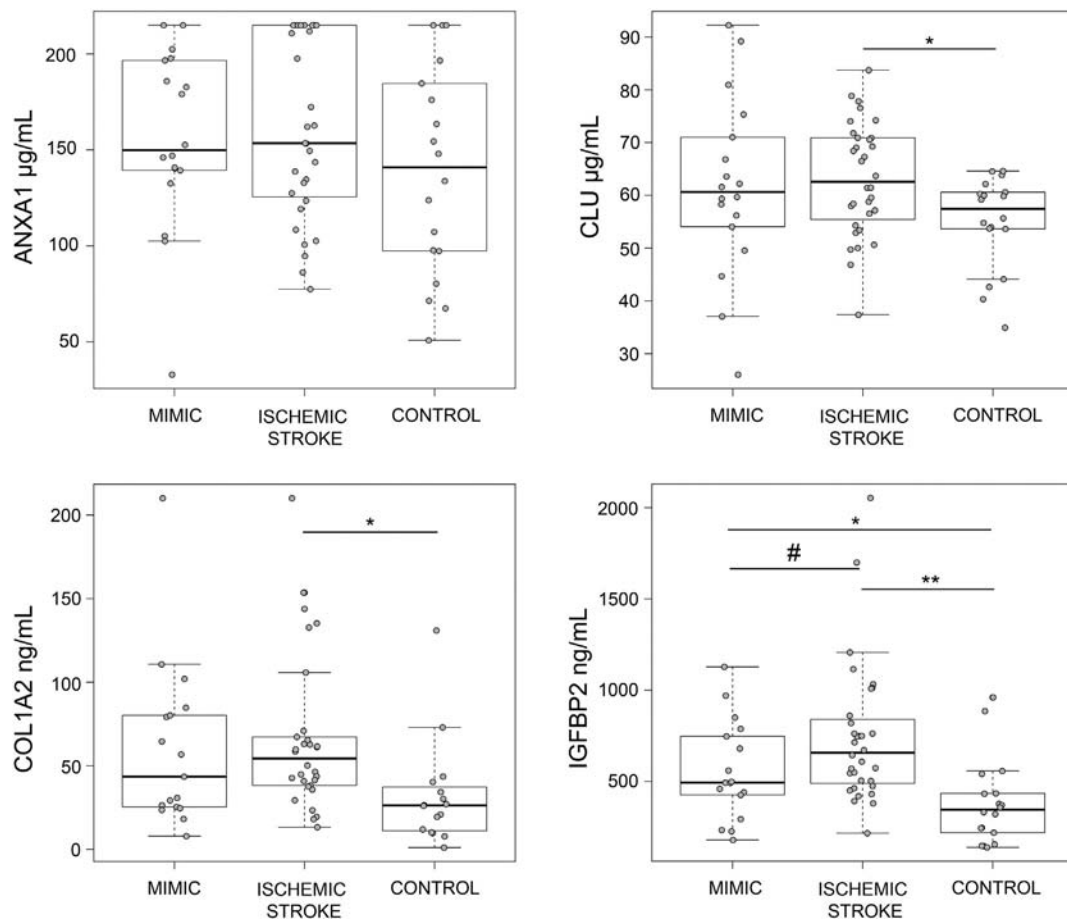


Fig. 5. Circulating levels of ANXA1, CLU, COL1A2 and IGFBP2 in serum samples from patients with ischemic stroke (32), patients diagnosed with mimicking conditions (18) and healthy controls (18). CLU showed a normal distribution and T-test or ANOVA were performed. ANXA1, COL1A2 and IGFBP2 were non-normally distributed and Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis comparisons were performed. **p < 0.01; *p < 0.05; #p < 0.1. In box plot, median and interquartile range are indicated.

Apart from MMPs activity, oxidative stress and reactive oxygen species generation also contributes to BBB disruption after brain ischemia [55]. Peroxiredoxin system is intimately implicated in the regulation of oxidative stress and, in this line of evidence, the immunoreactivity of PRDX3, a mitochondrion membrane protein with an antioxidant role, has been previously found significantly increased until 5 days after reperfusion in gerbils subjected to transient cerebral ischemia [56]. Moreover, neuroprotective effects were evident when PRDX3 was administered alone or in combination with thioredoxin-2. Our results suggest that the substantial increase of PRDX3 secretion after OGD might be promoted by cell disruption and the consequent release of cytoplasmic content into the media.

IGFBP2 is the main IGFBP of the cerebrospinal fluid and regulates insulin-like growth factors in the central nervous system, which are essential for its proper development, protein and carbohydrates anabolism, myelinogenesis, neuronal differentiation and survival [57,58]. However, it is still uncertain if IGFBP2 has an inhibitory or stimulatory role on insulin-like growth factors [58]. We found decreased secreted levels of IGFBP2 from hCMEC/D3 cells after OGD, which contrast with previous studies conducted in rat primary cultures of brain microvascular endothelial cells (BMEC) that found no differences in IGFBP2 secretion after OGD [59].

After proteomics characterization of hCMEC/D3 cells secretome, we assessed the potential of 5 of the replicated proteins to become new biomarkers of cerebral ischemia. We analyzed, for the first time to our knowledge, serum levels of COL1A2, CLU, IGFBP2, ANXA1 and PRDX3 in patients with ischemic stroke compared to patients showing mimicking conditions and healthy controls. Our results suggest that, although CLU, COL1A2 and IGFBP2 showed significant differences between ischemic stroke patients and healthy controls, IGFBP2 is the only candidate with a greater potential of becoming a biomarker for ischemic stroke diagnosis, since it showed differential circulating levels between ischemic stroke and stroke-mimicking conditions. In general, these small differences between ischemic stroke patients and mimicking conditions might be explained by the subtle influence on BBB structure described also in some types of tumors [60] and seizure [61].

However, it is important to notice that IGFBP2 levels in serum samples were not in concordance with the clear decrease on its secretion by hCMEC/D3 cells detected in-vitro after OGD. Similarly, we detected decreased secreted levels of COL1A2 and CLU in endothelial cells subjected to ischemia but these differences were oppositely reflected in blood after ischemic stroke. TIMP2 has also been previously described to be increased in blood from ischemic stroke patients compared to healthy controls [62], although in previous studies performed by our group we could not find any difference regarding TIMP2 circulating levels among ischemic stroke patients, mimics and healthy controls (data not published). This suggests that circulating levels of IGFBP2, COL1A2, CLU and TIMP2 are not influenced by endothelial cells during ischemia and are masked by other cell types. A plausible explanation for the inconsistency between our in-vitro results and results from blood samples is that a slow turn-over of these proteins hinders the detection of a rapid decrease of their circulating levels during ischemia.

We are aware of some limitations of our work. First, proteomic analysis based on SILAC requires FBS deprivation and several washing steps in order to limit the interference of most abundant serum proteins in MS analysis. These procedures are aggressive and might have slight effects on the phenotype of the cells in the culture. Second, although hCMEC/D3 cell cultures are considered a good and simple endothelial cells BBB in-vitro model, they do not include all the components that are involved in the BBB regulation. Future studies might address the optimization of co-culture conditions with astrocytes and pericytes, taking into account the scalability process required to obtain the sample amount needed for secretome analysis. Besides, the use of confluent cell cultures would be desirable to analyze the involvement of the identified proteins in variations of the BBB permeability. Third, the relative low abundance of some expected proteins such as metalloproteinases

and the inability to perform sample fractionation before trypsin digestion might have hindered their detection and quantification. Finally, the number of individuals included in the ELISA assays was limited. Although at least one marker (IGFBP2) showed a clear potential to become a biomarker useful for the diagnosis of ischemic stroke, more research is needed including greater cohorts recruited in a multicentre study. This would assess the real potential for diagnosis or their value as prognostic predictors after cerebral ischemia, in relation to different processes involved in stroke outcome related to massive BBB leakage, such as hemorrhagic transformation complications.

Our SILAC approach allowed us to describe new molecules associated with brain ischemia and that might be involved in BBB disruption and to gain knowledge about that process. However, it resulted not adequate for the discovery of stroke diagnosis biomarkers.

5. Conclusion

We have characterized for the first time the secretome of the human BBB in-vitro model of hCMEC/D3 cells by SILAC and identified changes produced after OGD. We analyzed the replicated candidates in human blood samples and found IGFBP2 as a potential candidate for ischemic stroke diagnosis.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding sources

Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) and is partially funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI11/00176), Instituto de Salud Carlos III and co-financed by the European Regional Development Fund, (FEDER). VHIO Proteomics Laboratory is a member of Proteored, PRB2-ISCIII and is supported by grant PT13/0001, of the PEI + D + i 2013–2016, funded by Instituto de Salud Carlos III and FEDER. V. Llombart is supported by a predoctoral fellowship from Vall d'Hebron Institute of Research. A. Bustamante is supported by a Rio Hortega contract (CM/00265) and M. Hernández-Guillamon is supported by the Miquel Servet program (CP12/0359), both from the Instituto de Salud Carlos III. A. Simats holds a predoctoral fellowship (2015 FLB 00952) from the AGAUR.

Notes

All authors declare no conflict of interests.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.011>.

References

- [1] V. Muoio, P.B. Persson, M.M. Sendeski, The neurovascular unit – concept review, *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 210 (2014) 790–798, <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12250>.
- [2] M. Mãe, A. Armulik, C. Betsholtz, Getting to know the cast–cellular interactions and signaling at the neurovascular unit, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 2750–2754.
- [3] R.A. Hawkins, R.L. O'Kane, I.A. Simpson, J.R. Viña, Structure of the blood–brain barrier and its role in the transport of amino acids, *J. Nutr.* 136 (2006) 218S–226S.
- [4] E. Urich, S.E. Lazic, J. Molnos, I. Wells, P.-O. Freskgård, Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood–brain barrier models, *PLoS ONE* 7 (2012), e38149 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038149>.
- [5] D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, et al., Heart disease and stroke statistics–2015 update: a report from the American heart association, *Circulation* 131 (2015) e29–322, <http://dx.doi.org/10.1161/CIR.000000000000152>.

- [6] S. Engelhardt, S. Patkar, O.O. Ogunshola, Cell-specific blood–brain barrier regulation in health and disease: a focus on hypoxia, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1210–1230, <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12489>.
- [7] Y. Yang, G.A. Rosenberg, Blood–brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease, *Stroke J. Cereb. Circ.* 42 (2011) 3323–3328, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257>.
- [8] K. Tsuji, T. Aoki, E. Tejima, K. Arai, S.-R. Lee, D.N. Atochin, et al., Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia, *Stroke J. Cereb. Circ.* 36 (2005) 1954–1959, <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000177517.01203.eb>.
- [9] J.M. Wardlaw, S.L. Keir, J. Seymour, S. Lewis, P.A.G. Sandercock, M.S. Dennis, et al., What is the best imaging strategy for acute stroke? *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 8 (2004) (iii, ix–x, 1–180).
- [10] G.J. del Zoppo, J.L. Saver, E.C. Jauch, H.P. Adams, on behalf of the A.H.A.S. Council, Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association, *Stroke* 40 (2009) 2945–2948, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.192535>.
- [11] W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, et al., Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1317–1329, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>.
- [12] M. Ebinger, B. Winter, M. Wendi, J.E. Weber, C. Waldschmidt, M. Rozanski, et al., Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial, *J. Am. Med. Assoc.* 311 (2014) 1622, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.2850>.
- [13] B.B. Weksler, E.A. Subileau, N. Perrière, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, et al., Blood–brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB J.* 19 (2005) 1872–1874, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-3458fje>.
- [14] S.M. Carl, D.J. Lindley, D. Das, P.O. Couraud, B.B. Weksler, I. Romero, et al., ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood–brain barrier cell line, hCMEC/D3 [corrected], *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1057–1068, <http://dx.doi.org/10.1021/mp900178j>.
- [15] S. Ohtsuki, C. Ikeda, Y. Uchida, Y. Sakamoto, F. Miller, F. Glacial, et al., Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood–brain barrier model, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 289–296, <http://dx.doi.org/10.1021/mp3004308>.
- [16] S. Dauchy, F. Miller, P.-O. Couraud, R.J. Weaver, B. Weksler, I.-A. Romero, et al., Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 897–909, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.001>.
- [17] B. Poller, H. Gutmann, S. Krähenbühl, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, et al., The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood–brain barrier model for drug transport studies, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1358–1368.
- [18] K.-A. Hossmann, Cerebral ischemia: models, methods and outcomes, *Neuropharmacology* 55 (2008) 257–270, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.004>.
- [19] K.M. Cowan, A.S. Easton, Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood–brain barrier, *Brain Res.* 1332 (2010) 20–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.066>.
- [20] C. Merino-Zamorano, M. Hernández-Guillamon, A. Jullienne, A. Le Béhot, I. Bardou, M. Parés, et al., NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke, *Stroke J. Cereb. Circ.* 46 (2015) 477–484, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006826>.
- [21] H.C. Harsha, H. Molina, A. Pandey, Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 505–516, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.2>.
- [22] J.A. Vizcaíno, E.W. Deutsch, R. Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Ríos, et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 223–226, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2839>.
- [23] J.E. Elias, S.P. Gygi, Target–decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry, *Nat. Methods* 4 (2007) 207–214, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1019>.
- [24] F.W. Pagliuca, M.O. Collins, A. Lichawska, P. Zegerman, J.S. Choudhary, J. Pines, Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery, *Mol. Cell* 43 (2011) 406–417, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.031>.
- [25] L.J. Jensen, M. Kuhn, M. Stark, S. Chaffron, C. Creevey, J. Muller, et al., STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D412–D416, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn760>.
- [26] S. Hartwig, S. Raschke, B. Knebel, M. Scheler, M. Immler, W. Passlack, et al., Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1844 (2014) 1011–1017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.08.004>.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] J. Montaner, M. Perea-Gainza, P. Delgado, M. Ribó, P. Chacón, A. Rosell, et al., Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers, *Stroke J. Cereb. Circ.* 39 (2008) 2280–2287, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.505354>.
- [29] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 376–386.
- [30] M. Mann, Functional and quantitative proteomics using SILAC, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 952–958, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2067>.
- [31] T. Sanderson, M. Galloway, R. Kumar, Unfolding the unfolded protein response: unique insights into brain ischemia, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 7133–7142, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16047133>.
- [32] A.G. Herrmann, R.F. Deighton, T. Le Bihan, M.C. McCulloch, J.L. Searcy, L.E. Kerr, et al., Adaptive changes in the neuronal proteome: mitochondrial energy production, endoplasmic reticulum stress, and ribosomal dysfunction in the cellular response to metabolic stress, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33 (2013) 673–683, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2012.204>.
- [33] S. Tajiri, S. Oyadomari, S. Yano, M. Morioka, T. Gotoh, J.I. Hamada, et al., Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 403–415, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401365>.
- [34] T. Hayashi, A. Saito, S. Okuno, M. Ferrand-Drake, R.L. Dodd, P.H. Chan, Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25 (2005) 41–53, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600005>.
- [35] I. Prudovsky, Nonclassically secreted regulators of angiogenesis, *Angiol. Open Access* 1 (2013) 1000101, <http://dx.doi.org/10.4172/2329-9495.1000101>.
- [36] W.S. Mailliard, H.T. Haigler, D.D. Schlaepfer, Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 719–725.
- [37] J.C. Buckingham, C.D. John, E. Solito, T. Tierney, R.J. Flower, H. Christian, et al., Annexin 1, glucocorticoids, and the neuroendocrine-immune interface, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088 (2006) 396–409, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1366.002>.
- [38] A.K. McNeil, U. Rescher, V. Gerke, P.L. McNeil, Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35202–35207, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M606406200>.
- [39] E. Solito, C. de Coupade, S. Canaider, N.J. Goulding, M. Perretti, Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation, *Br. J. Pharmacol.* 133 (2001) 217–228, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704054>.
- [40] F.N.E. Gavins, J. Dallij, R.J. Flower, D.N. Granger, M. Perretti, Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation, *FASEB J.* 21 (2007) 1751–1758, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7842com>.
- [41] L. Minghetti, A. Nicolini, E. Polazzi, A. Greco, M. Perretti, L. Parente, et al., Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1, *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 1307–1314, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702423>.
- [42] D.J. Prockop, K.I. Kivirikko, L. Tuderman, N.A. Guzman, The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts), *N. Engl. J. Med.* 301 (1979) 77–85, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197907123010204>.
- [43] X. Zou, B. Feng, T. Dong, G. Yan, B. Tan, H. Shen, et al., Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis, *J. Proteomics* 94 (2013) 473–485, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.020>.
- [44] E. Candelario-Jalil, Y. Yang, G.A. Rosenberg, Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia, *Neuroscience* 158 (2009) 983–994, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.025>.
- [45] L. Goffin, Q. Seguin-Estévez, M. Alvarez, W. Reith, C. Chizzolini, Transcriptional regulation of matrix metalloproteinase-1 and collagen 1A2 explains the anti-fibrotic effect exerted by proteasome inhibition in human dermal fibroblasts, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R73, <http://dx.doi.org/10.1186/ar2991>.
- [46] J. Liu, X. Jin, K.J. Liu, W. Liu, Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood–brain barrier damage in early ischemic stroke stage, *J. Neurosci.* 32 (2012) 3044–3057, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012>.
- [47] B. Reuter, C. Rodemer, S. Grudzinski, P.-O. Couraud, B. Weksler, I.A. Romero, et al., Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors in a human endothelial cell culture model of cerebral ischemia, *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 35 (2013) 514–520, <http://dx.doi.org/10.1159/000350731>.
- [48] O. Blaschuk, K. Burdzy, I.B. Fritz, Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7714–7720.
- [49] S. Jeong, D.R. Ledee, G.M. Gordon, T. Itakura, N. Patel, A. Martin, et al., Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 2028–2039, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.025>.
- [50] N. Sivamurthy, D.H. Stone, F.W. LoGerfo, W.C. Quist, Apolipoprotein J inhibits the migration and adhesion of endothelial cells, *Surgery* 130 (2001) 204–209, <http://dx.doi.org/10.1067/msy.2001.115823>.
- [51] I.P. Trougakos, The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches — a mini-review, *Gerontology* 59 (2013) 514–523, <http://dx.doi.org/10.1159/000351207>.
- [52] M.R. Wilson, S.B. Easterbrook-Smith, Clusterin is a secreted mammalian chaperone, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 95–98.
- [53] B.H. Han, R.B. DeMattos, L.L. Dugan, J.S. Kim-Han, R.P. Brendza, J.D. Fryer, et al., Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia, *Nat. Med.* 7 (2001) 338–343, <http://dx.doi.org/10.1038/85487>.
- [54] Y. Charney, A. Imhof, P.G. Vallet, E. Kovari, C. Bouras, P. Giannakopoulos, Clusterin in neurological disorders: molecular perspectives and clinical relevance, *Brain Res. Bull.* 88 (2012) 434–443, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.006>.
- [55] D. Radak, I. Resanovic, E.R. Isenovic, Link between oxidative stress and acute brain ischemia, *Angiology* 65 (2014) 667–676, <http://dx.doi.org/10.1177/0003319713506516>.
- [56] I.K. Hwang, K.-Y. Yoo, D.W. Kim, C.H. Lee, J.H. Choi, Y.-G. Kwon, et al., Changes in the expression of mitochondrial peroxiredoxin and thioredoxin in neurons and glia and their protective effects in experimental cerebral ischemic damage, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1242–1251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.007>.
- [57] V.C. Russo, P.D. Gluckman, E.L. Feldman, G.A. Werther, The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain, *Endocr. Rev.* 26 (2005) 916–943, <http://dx.doi.org/10.1210/er.2004-0024>.

- [58] D. Chesik, J. De Keyser, N. Wilczak, Insulin-like growth factor binding protein-2 as a regulator of IGF actions in CNS: implications in multiple sclerosis, *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (2007) 267–278, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.001>.
- [59] J. Wang, Y. Tang, W. Zhang, H. Zhao, R. Wang, Y. Yan, et al., Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia, *FEBS J.* 280 (2013) 3658–3668, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12359>.
- [60] L.G. Dubois, L. Campanati, C. Righy, I. D'Andrea-Meira, T.C.L.d.S.E. Spohr, I. Porto-Carreiro, et al., Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 418, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00418>.
- [61] J.A. Gorter, E.A. van Vliet, E. Aronica, Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis, *Epilepsy Behav.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.047>.
- [62] I. Vukasovic, A. Tesija-Kuna, E. Topic, V. Supanc, V. Demarin, M. Petrovic, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes, *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 44 (2006) 428–434, <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2006.079>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Victor Llombart¹, Teresa García-Berrocoso¹, Joan Josep Bech-Serra², Alba Simats¹, Alejandro Bustamante¹, Dolors Giralt¹, Gemma Reverter-Branchat², Francesc Canals², Mar Hernández-Guillamon¹, Joan Montaner¹

1- Neurovascular Research Laboratory, Vall d’Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

2- Proteomics Laboratory, Vall d’Hebron Institute of Oncology (VHIO), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

INDEX

Supplemental table I	65
Supplemental table II	70
Supplemental table III	70
Supplemental table IV	71
Supplemental figure 1	76
Supplemental figure 2	77

Supplementary table I: List of 117 proteins identified and quantified in both cross-labeled SILAC experiments with ≥ 2 peptides, with a CV<30% among identical peptides, and showed an identification score>30.

Accession Swiss-prot	Gene Name	Protein	light (normoxia/normoglycemia) vs heavy (OGD)					heavy (normoxia/normoglycemia) vs light (OGD)				
			Scores ^a	# Peptides ^b	# (L/H) ^c	CV [%](L/H) ^d	Norm L/H ^e	Norm H/L	CV [%](H/L)	# (H/L)	# Peptides	Scores
CH10_HUMAN	HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	471.8	7	4	22.58	-1.2	-1.25	15.81	4	8	539
1433B_HUMAN	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	1,972	21	8	3.63	1	1.08	4.62	11	22	1,903
1433Z_HUMAN	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	3,962	26	10	1.63	1.04	1.05	3.55	13	24	3,801
RS28_HUMAN	RPS28	40S ribosomal protein S28	215	4	2	2.30	-1.2	-1.21	1.41	2	4	290.9
RSSA_HUMAN	RPSA	40S ribosomal protein SA	65.3	5	4	22.39	-1.12	-1.29	14.95	4	9	390.5
AN32B_HUMAN	ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	392.7	6	2	11.62	1.57	2.73	22.91	3	4	501.6
ARPC4_HUMAN	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	335.9	4	2	5.98	-1.06	-1.1	7.50	2	5	401.2
SAHH_HUMAN	AHCY	Adenosylhomocysteinase	51.5	4	2	5.38	-1.11	-1.09	4.96	3	5	128
ALDR_HUMAN	AKR1B1	Aldose reductase	855	19	10	10.93	1.13	1.07	23.62	10	16	968.7
ENOA_HUMAN	ENO1	Alpha-enolase	15,551	55	23	11.09	1.06	1.22	16.85	21	49	17,355
ANXA1_HUMAN	ANXA1	Annexin A1	1,426	15	7	6.90	-1.42	-1.66	3.49	11	22	1,652
B2MG_HUMAN	B2M	Beta-2-microglobulin	609	7	3	10.53	1.6	1.24	3.29	3	6	633.6
PGS1_HUMAN	BGN	Biglycan	544.9	7	5	13.19	2.21	2.26	8.48	4	5	256.9
BASP1_HUMAN	BASP1	Brain acid soluble protein 1	580.4	11	6	21.93	1.09	1.15	17.22	7	13	480.4
CALM_HUMAN	CALM1	Calmodulin	1,404	16	9	21.56	-1.05	-1.01	20.64	8	12	1,752
CALR_HUMAN	CALR	Calreticulin	470.6	10	5	20.19	1.15	1.52	3.65	3	4	121.7
CAH2_HUMAN	CA2	Carbonic anhydrase 2	198.7	6	3	13.20	1.21	1.28	6.18	2	2	52.5
CD166_HUMAN	ALCAM	CD166 antigen	268.2	8	3	9.20	1.27	1.09	27.40	3	7	337.6
MUC18_HUMAN	MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18	511.2	12	5	21.70	1.35	1.21	26.73	3	3	136.1
CISY_HUMAN	CS	Citrate synthase, mitochondrial	114.8	6	4	5.38	-1.84	-1.75	17.77	2	2	77.6
CLUS_HUMAN	CLU	Clusterin	293.4	6	4	11.56	1.95	2.09	6.53	4	7	315.7

CO1A2_HUMAN	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	148.4	5	3	13.64	1.52	3.27	25.56	6	11	585.6
C1QBP_HUMAN	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	282.2	6	3	18.83	-1.01	-1.58	22.40	3	5	365.5
CFAB_HUMAN	CFB	Complement factor B	150.8	2	2	3.44	2.38	1.47	17.73	2	2	91.8
COR1C_HUMAN	CORO1C	Coronin-1C	272	7	3	9.90	-1.41	-1.06	23.87	3	7	351.1
AMPL_HUMAN	LAP3	Cytosol aminopeptidase	148.2	3	2	2.26	1.07	1.18	10.53	3	3	82.5
DEST_HUMAN	DSTN	Dextrin	135.9	3	2	24.27	-1.63	-1.02	17.54	2	4	201.2
FBLN3_HUMAN	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	3,521	35	15	5.71	1.77	2.16	21.48	14	23	2,769
EF1G_HUMAN	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	119.8	5	3	3.78	-1.32	-1.01	13.95	11	19	680.4
NPC2_HUMAN	NPC2	Epididymal secretory protein E1	218.4	3	2	5.88	1.47	1.2	4.74	2	3	101.5
IF4A1_HUMAN	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	305.4	12	5	15.82	-1.51	-1.27	10.58	9	19	638.5
IF4A2_BOVIN	EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	222.1	8	3	14.97	-1.39	-1.22	3.74	4	11	357.3
IF4B_HUMAN	EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	107.1	3	2	9.28	-1.16	-1.03	14.20	3	3	78.7
IF5A1_HUMAN	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	1,090	10	5	11.88	-1.2	-1.06	9.73	4	11	1,831
CAZA1_HUMAN	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	60.7	3	2	3.81	1.11	1.07	7.20	4	6	117.1
FAS_HUMAN	FASN	Fatty acid synthase	942.6	29	19	24.03	-1.35	-1.28	25.18	34	55	2,057
FINC_HUMAN	FN1	Fibronectin	227	12	8	22.55	-1.09	-1.35	23.17	12	16	389.2
FLNA_HUMAN	FLNA	Filamin-A	2,518	63	33	12.73	-1.27	-1.22	18.16	43	77	3,658
FLNB_HUMAN	FLNB	Filamin-B	1,946	65	36	22.26	-1.02	-1.31	22.23	38	65	2,224
FLNC_HUMAN	FLNC	Filamin-C	315.9	7	4	15.33	-1.22	-1.24	9.80	6	10	389.4
FSTL1_HUMAN	FSTL1	Follistatin-related protein 1	818.3	12	7	14.72	1.85	1.41	14.49	6	8	527.2
LEG1_HUMAN	LGALS1	Galectin-1	1,252	11	5	5.03	-1.12	-1.07	8.38	7	12	2,118
ENOG_HUMAN	ENO2	Gamma-enolase	4,237	10	5	9.05	1.02	1.13	5.10	3	8	5,300
GELS_HUMAN	GSN	Gelsolin	197.1	5	3	10.03	1.46	2.16	5.96	3	5	170.8
GSTO1_HUMAN	GSTO1	Glutathione S-transferase omega-1	106.2	5	2	14.18	-1.03	-1.1	20.81	4	6	201.8
GSTP1_HUMAN	GSTP1	Glutathione S-transferase P	1,232	10	5	6.64	1.08	1.03	9.42	8	12	1,237
G3P_HUMAN	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5,941	30	11	5.63	1.32	1.21	12.77	12	27	6,683
GLOD4_HUMAN	GLOD4	Glyoxalase domain-containing protein 4	118.7	4	3	6.23	1.11	1.03	1.59	2	2	59.5
GBLP_HUMAN	GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	516.9	11	6	14.77	-1.08	-1.25	29.20	6	13	485.1

HSP7C_HUMAN	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	3,416	48	19	7.82	-1.11	-1.07	6.45	22	50	4,080
HS105_HUMAN	HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	135.6	5	2	14.79	-1.12	-1.12	6.65	2	6	266.5
HSPB1_HUMAN	HSPB1	Heat shock protein beta-1	355.2	6	3	12.79	-1.58	-1.18	13.78	4	10	515.5
HDGF_HUMAN	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	70.8	3	2	11.24	1.07	1.23	15.16	3	7	133.6
HNRPK_HUMAN	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	230.9	6	4	16.59	-1.55	-1.21	24.22	10	17	872.3
ROA2_HUMAN	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1,488	25	14	14.41	-1.17	-1.03	7.23	14	23	1,525
H2A1B_HUMAN	HIST1H2AB	Histone H2A type 1-B/E	751.5	6	4	5.86	1.25	1.29	4.73	4	8	466.3
H2AX_HUMAN	H2AFX	Histone H2A.x	373.4	6	3	6.77	1.25	1.23	4.83	4	7	195.8
H2B1B_HUMAN	HIST1H2BB	Histone H2B type 1-B	1,243	8	3	1.19	1.28	1.4	4.14	2	4	935.1
H3C_HUMAN	H3F3C	Histone H3.3C	132.7	7	4	6.14	1.35	1.29	8.38	5	7	47.8
H4_HUMAN	HIST1H4A	Histone H4	1,148	12	6	8.50	1.27	1.42	20.03	6	9	839.7
IPO9_HUMAN	IPO9	Importin-9	57.5	2	2	0.86	-1.17	-1.06	1.20	3	4	143.4
IPYR_HUMAN	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	42.6	3	2	20.05	-1.51	-1.26	27.40	5	8	295.9
IBP2_HUMAN	IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	474.8	9	5	17.49	2.33	2.23	16.96	5	9	653.8
IBP4_HUMAN	IGFBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	207.5	5	4	16.46	1.6	1.51	18.50	6	9	393.9
IBP7_HUMAN	IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	869.4	12	7	5.79	1.91	1.99	23.84	8	9	439.9
MX1_HUMAN	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	428	7	4	16.06	-1.46	-1.1	9.60	7	10	456.5
ILF3_HUMAN	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3	148.9	6	3	17.38	1.09	1.07	19.67	10	12	428.8
LDHA_HUMAN	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	3,489	33	17	17.60	1.09	1.08	12.64	19	34	3,601
MDHM_HUMAN	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1,080	16	6	8.83	-1.11	-1.19	12.29	8	19	840.3
TIMP2_HUMAN	TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	290.3	4	2	4.80	1.87	1.57	26.45	4	5	262.4
MAP4_HUMAN	MAP4	Microtubule-associated protein 4	226.6	9	5	18.39	-1.03	-1.38	21.89	8	12	292.7
ML12A_HUMAN	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	204.3	7	4	5.77	1.26	1.08	20.29	2	5	181.6
NQO1_HUMAN	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	428	6	3	7.82	-1.41	-1.22	28.46	4	9	730.5
AHNK_HUMAN	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	98.5	5	3	27.73	-1.96	-1.49	16.83	13	23	440
NAMPT_HUMAN	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	275	8	5	10.69	1.09	1.14	15.16	2	5	255.2
NID1_HUMAN	NID1	Nidogen-1	101.8	4	3	6.76	1.32	1.09	18.22	2	2	38.9
HMG2_HUMAN	HMG2	Non-histone chromosomal protein HMG-17	41.9	2	2	5.65	-1.06	-1.19	14.36	2	4	86.6

YBOX1_HUMAN	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	301.5	9	4	22.24	1.13	1.16	18.65	6	9	291.5
NDKB_HUMAN	NME2	Nucleoside diphosphate kinase B	1,215	11	3	4.30	1.07	1.03	7.81	6	12	1,137
PTX3_HUMAN	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	890.5	14	7	17.55	1.73	1.13	12.46	5	12	628.5
PPIA_HUMAN	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,691	16	7	3.20	1.07	1.15	19.67	5	16	4,899
PPIB_HUMAN	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	259.7	9	6	7.21	1.6	1.18	8.76	3	5	175.3
PRDX1_HUMAN	PRDX1	Peroxiredoxin-1	327.9	14	6	10.12	-1.05	-1.07	15.03	9	12	437
PEBP1_HUMAN	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	753.5	9	6	8.03	1.06	1.26	16.38	5	11	937.8
PGK1_HUMAN	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	2,359	34	13	8.45	1.12	1.12	6.51	12	25	2,217
PGAM1_HUMAN	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	543.9	17	10	17.39	1.04	1.07	25.30	12	18	703.5
PCBP1_RABIT	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	60.8	2	2	7.03	-1.2	-1.14	25.62	4	4	239.9
PROF1_HUMAN	PFN1	Profilin-1	1,589	16	6	1.51	1.01	1.01	6.11	7	15	1,522
PCNA_HUMAN	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	308.5	8	4	28.07	1.11	1.03	16.02	4	10	615.1
PA2G4_HUMAN	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	197.6	9	3	5.65	1	1.08	20.36	5	10	235
PSA1_HUMAN	PSMA1	Proteasome subunit alpha type-1	362.6	8	5	13.18	1.09	1.02	29.06	5	7	314.9
PSA2_HUMAN	PSMA2	Proteasome subunit alpha type-2	209.5	11	7	7.39	1.08	1.06	21.91	5	6	279.9
PSA7_HUMAN	PSMA7	Proteasome subunit alpha type-7	167.3	8	4	5.24	1.11	1.3	26.17	2	5	253.8
PSB6_HUMAN	PSMB6	Proteasome subunit beta type-6	81.1	3	2	11.08	-1.14	-1.11	21.98	2	3	147
TGM2_HUMAN	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	473.1	10	5	7.47	-1.68	-1.13	18.68	5	8	262.2
PTMA_HUMAN	PTMA	Prothymosin alpha	643.4	8	5	18.91	-1.08	-1.34	16.05	2	6	329.5
KPYM_HUMAN	PKM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2,627	42	16	18.55	-1.07	-1.07	22.72	21	45	4,257
RADI_HUMAN	RDX	Radixin	485.8	19	9	15.96	-1.04	-1.05	16.58	4	10	390
IQGA1_HUMAN	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	503.1	10	4	17.35	-1.39	-1.1	18.07	16	23	992.6
SIAS_HUMAN	NANS	Sialic acid synthase	64.6	3	3	21.66	-1.08	-1.07	29.65	4	4	38.6
SPRC_HUMAN	SPARC	SPARC	941.5	17	10	21.97	2.03	1.86	16.86	6	12	674.8
SMOC1_HUMAN	SMOC1	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	327.6	11	6	4.62	1.61	2.6	8.64	7	10	300.2
STIP1_HUMAN	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	216.9	8	6	15.58	-1.25	-1.02	23.53	7	11	593.4
QSOX1_HUMAN	QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	44	3	3	16.52	1.85	1.28	2.80	2	3	80.7
UBC9_HUMAN	UBE2I	SUMO-conjugating enzyme UBC9	166.7	5	3	9.53	1.01	1.08	10.04	2	4	356.6

TLN1_HUMAN	TLN1	Talin-1	272.8	14	11	23.37	-1.14	-1.05	26.34	41	59	3,498
TCPOQ_HUMAN	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta	129	7	3	4.56	-1.12	-1.04	17.05	7	11	216.5
PRDX3_HUMAN	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	64.7	4	2	8.54	-1.41	-1.52	17.36	3	4	77.2
TAGL2_HUMAN	TAGLN2	Transgelin-2	877.3	15	4	9.52	-1.33	-1.02	16.08	11	21	1,250
TCTP_HUMAN	TPT1	Translationally-controlled tumor protein	101.4	5	3	17.22	-1.24	-1.02	27.71	4	8	328.8
TBA1B_HUMAN	TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	1,973	19	7	26.52	-1.76	-1.05	22.78	13	25	3,160
TBB4B_HUMAN	TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	1,200	20	9	25.16	-1.63	-1.09	18.30	13	34	3,024
OTUB1_HUMAN	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	48.8	3	2	1.64	-1.12	-1.02	8.80	4	4	59.5
ISG15_HUMAN	ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15	123.6	3	2	15.10	-1.05	-1.16	14.40	2	3	72.9
UAP1_HUMAN	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	45.1	2	2	29.69	-1.44	-1.46	13.28	4	5	149.5
VIME_HUMAN	VIM	Vimentin	3,222	43	19	21.72	-1.46	-1.06	11.00	26	54	4,548
XRCC6_HUMAN	XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	236.6	4	2	2.42	-1.7	-1.04	13.22	3	5	249.7

All proteins of the list were found in the secretome of two SILAC experiments with hCMEC/D3 cells (cross-labeling) with ≥ 2 peptides, with a CV<30% among identical peptides, and showed an identification Score>30. ^a indicates the number of peptides that have been identified; ^b indicates the number of peptides that could be quantified and compared between light (L) and heavy (H) labeling; ^c indicates the coefficient of variation of the ratios L/H performed; ^d indicates the fold change between normoxia/normoglycemia and OGD (a – sign indicates over-secretion in OGD conditions)

Supplemental table II: Top IPA diseases that involved proteins over and under-secreted after OGD compared to normoxia/normoglycemia conditions.

over-secreted after OGD			under-secreted after OGD		
Term	Number of proteins	p-value	Term	Number of proteins	p-value
Neurological Disease	5	7E-3 – 2E-4	Neurological Disease	10	5E-2 – 3E-5
Psychological Disorders	4	6E-4	Psychological Disorders	7	5E-2 – 5E-5
Skeletal and Muscular Disorders 7,45E	5	7E-3 – 6E-4	Skeletal and Muscular Disorders	7	5E-2 – 5E-5
Inflammatory Response 2,09E	1	2E-2	Developmental Disorder	2	4E-3 – 2E-4
			Hereditary Disorder	5	4E-2 – 2E-4

Supplemental table III: Top IPA canonical pathways that involved proteins over-secreted in OGD or normoxia/normoglycemia conditions.

OGD	Normoxia/normoglycemia		
Term	p-value	Term	p-value
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	8.10E-05	Glycolysis I	1.09E-08
Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	1.32E-04	Gluconeogenesis I	1.09E-08
Actin Cytoskeleton Signaling	7.13E-04	IGF-1 signalling	3.96E-05
Telomere Extension by Telomerase	1.12E-03	Protein Ubiquitination pathway	1.70E-03
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.32E-03	Lipid antigen presentation by CD1	2.18E-03

Supplemental table IV: List of 117 proteins identified and quantified in both cross-labeled SILAC experiments with ≥ 2 peptides, with a CV<30% among identical peptides, and showed an identification score>30 and the corresponding predicted secretion.

swiss_prot	Protein	gene name	NN-score	Predicted signal peptide	Secreted
CH10_HUMAN	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	0.570	-	SP-
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	0.352	-	NS
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	0.252	-	NS
RS28_HUMAN	40S ribosomal protein S28	RPS28	0.522	-	SP-
RSSA_HUMAN	40S ribosomal protein SA	RPSA	0.620	-	SP-
AN32B_HUMAN	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	ANP32B	0.068	-	NS
ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	0.646	-	SP-
SAHH_HUMAN	Adenosylhomocysteinase	AHCY	0.507	-	SP-
ALDR_HUMAN	Aldose reductase	AKR1B1	0.395	-	NS
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	ENO1	0.536	-	SP-
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	ANXA1	0.511	-	SP-
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin	B2M	0.907	+	SP+
PGS1_HUMAN	Biglycan	BGN	0.714	+	SP+
BASP1_HUMAN	Brain acid soluble protein 1	BASP1	0.470	-	NS
CALM_HUMAN	Calmodulin	CALM1	0.676	-	SP-
CALR_HUMAN	Calreticulin	CALR	0.366	+	SP+
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	CA2	0.411	-	NS
CD166_HUMAN	CD166 antigen	ALCAM	0.463	+	SP+
MUC18_HUMAN	Cell surface glycoprotein MUC18	MCAM	0.256	+	SP+

CISY_HUMAN	Citrate synthase, mitochondrial	CS	0.570	-	SP-
CLUS_HUMAN	Clusterin	CLU	0.826	+	SP+
CO1A2_HUMAN	Collagen alpha-2	COL1A2	0.337	+	SP+
C1QBP_HUMAN	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	0.622	-	SP-
CFAB_HUMAN	Complement factor B	CFB	0.457	+	SP+
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	CORO1C	0.584	-	SP-
AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	LAP3	0.463	-	NS
DEST_HUMAN	Destrin	DSTN	0.622	-	SP-
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	0.719	+	SP+
EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	0.353	-	NS
NPC2_HUMAN	Epididymal secretory protein E1	NPC2	0.931	+	SP+
IF4A1_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	0.631	-	SP-
IF4A2_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-II	EIF4A2	0.494	-	NS
IF4B_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	0.573	-	SP-
IF5A1_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	0.319	-	NS
CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	0.480	-	NS
FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	FASN	0.408	-	NS
FINC_HUMAN	Fibronectin	FN1	0.369	+	SP+
FLNA_HUMAN	Filamin-A	FLNA	0.446	-	NS
FLNB_HUMAN	Filamin-B	FLNB	0.359	-	NS
FLNC_HUMAN	Filamin-C	FLNC	0.450	-	NS
FSTL1_HUMAN	Follistatin-related protein 1	FSTL1	0.533	+	SP+
LEG1_HUMAN	Galectin-1	LGALS1	0.345	-	NS
ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	ENO2	0.599	-	SP-
GELS_HUMAN	Gelsolin	GSN	0.553	+	SP+
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	0.435	-	NS

GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	GSTP1	0.545	-	SP-
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	0.467	-	NS
GLOD4_HUMAN	Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4	0.721	-	SP-
GBLP_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	0.465	-	NS
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	0.229	-	NS
HS105_HUMAN	Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	0.327	-	NS
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	HSPB1	0.740	-	SP-
HDGF_HUMAN	Hepatoma-derived growth factor	HDGF	0.477	-	NS
HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	0.177	-	NS
ROA2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	0.081	-	NS
H2A1B_HUMAN	Histone H2A type 1-B/E	HIST1H2AB	0.536	-	SP-
H2AX_HUMAN	Histone H2AX	H2AFX	0.535	-	SP-
H2B1B_HUMAN	Histone H2B type 1-B	HIST1H2BB	0.323	-	NS
H3C_HUMAN	Histone H3.3C	H3F3C	0.716	-	SP-
H4_HUMAN	Histone H4	HIST1H4A	0.408	-	NS
IPO9_HUMAN	Importin-9	IPO9	0.572	-	SP-
IPYR_HUMAN	Inorganic pyrophosphatase	PPA1	0.433	-	NS
IBP2_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein 2	IGFBP2	0.886	+	SP+
IBP4_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4	0.887	+	SP+
IBP7_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IGFBP7	0.536	+	SP+
MX1_HUMAN	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	MX1	0.211	-	NS
ILF3_HUMAN	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	0.057	-	NS
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	0.549	-	SP-
MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	0.644	-	SP-
TIMP2_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2	0.854	+	SP+
MAP4_HUMAN	Microtubule-associated protein 4	MAP4	0.251	-	NS

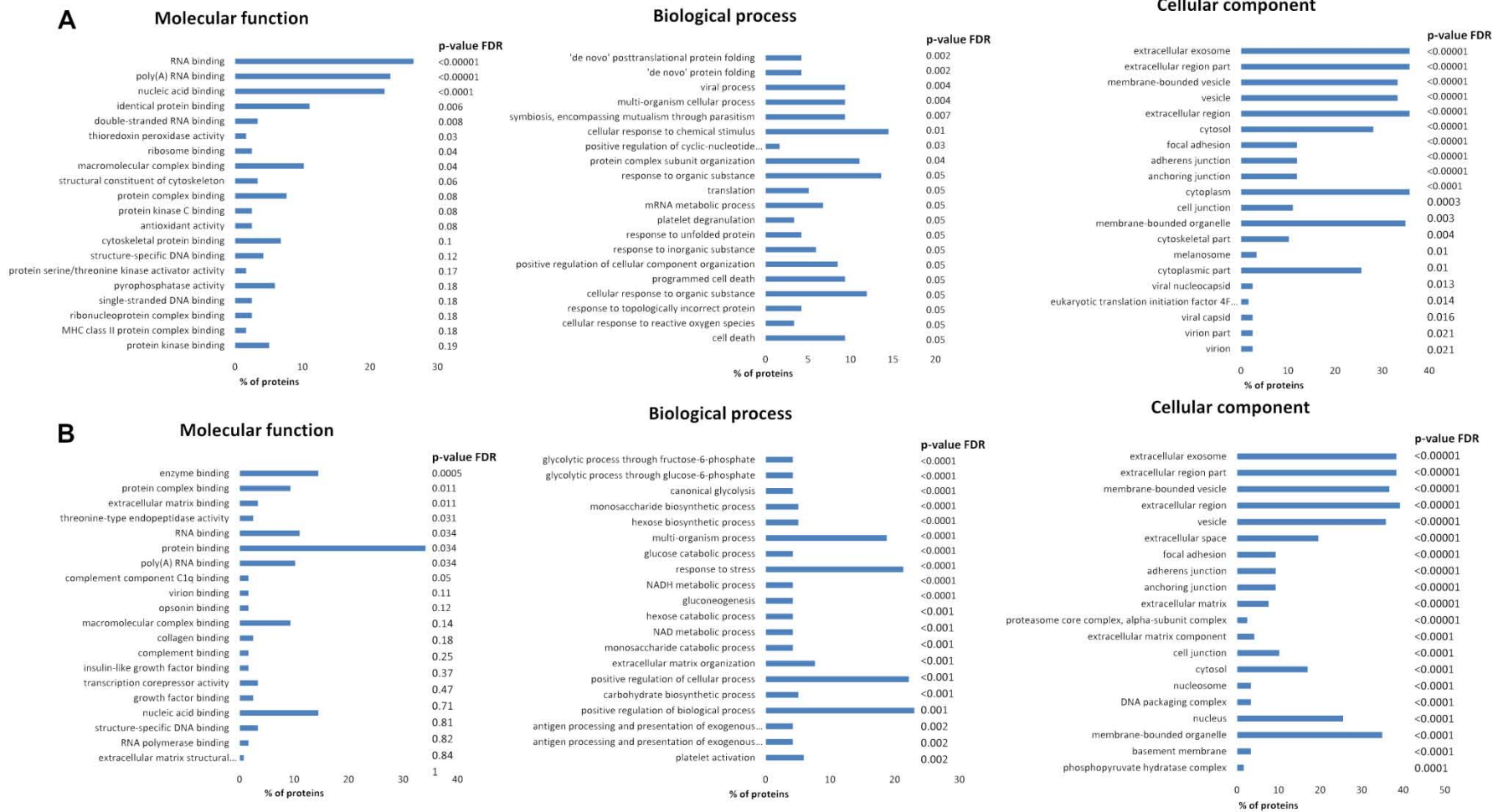
ML12A_HUMAN	Myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	0.607	-	SP-
NQO1_HUMAN	NAD	NQO1	0.768	-	SP-
AHNK_HUMAN	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	0.241	-	NS
NAMPT_HUMAN	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	0.302	-	NS
NID1_HUMAN	Nidogen-1	NID1	0.644	+	SP+
HMG2_HUMAN	Non-histone chromosomal protein HMG-17	HMG2	0.606	-	SP-
YBOX1_HUMAN	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	0.733	-	SP-
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	NME2	0.330	-	NS
PTX3_HUMAN	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	0.755	+	SP+
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	0.339	-	NS
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	0.853	+	SP+
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	PRDX1	0.528	-	SP-
PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	0.672	-	SP-
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	0.389	-	NS
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	0.407	-	NS
PCBP1_HUMAN	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	0.549	-	SP-
PROF1_HUMAN	Profilin-1	PFN1	0.469	-	NS
PCNA_HUMAN	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	0.566	-	SP-
PA2G4_HUMAN	Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	0.201	-	NS
PSA1_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	0.371	-	NS
PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	0.330	-	NS
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7	0.248	-	NS
PSB6_HUMAN	Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	0.563	-	SP-
TGM2_HUMAN	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	0.577	-	SP-
PTMA_HUMAN	Prothymosin alpha	PTMA	0.444	-	NS
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	PKM	0.420	-	NS

RADI_HUMAN	Radixin	RDX	0.310	-	NS
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	0.240	-	NS
SIAS_HUMAN	Sialic acid synthase	NANS	0.602	-	SP-
SPRC_HUMAN	SPARC	SPARC	0.942	+	SP+
SMOC1_HUMAN	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	SMOC1	0.349	+	SP+
STIP1_HUMAN	Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	0.344	-	NS
QSOX1_HUMAN	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	0.611	+	SP+
UBC9_HUMAN	SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBE2I	0.749	-	SP-
TLN1_HUMAN	Talin-1	TLN1	0.233	-	NS
TCPQ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	0.508	-	SP-
PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	0.756	-	SP-
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	TAGLN2	0.784	-	SP-
TCTP_HUMAN	Translationally-controlled tumor protein	TPT1	0.581	-	SP-
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	0.472	-	NS
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	0.501	-	SP-
OTUB1_HUMAN	Ubiquitin thioesterase OTUB1	OTUB1	0.406	-	NS
ISG15_HUMAN	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	0.702	-	SP-
UAP1_HUMAN	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	UAP1	0.526	-	SP-
VIME_HUMAN	Vimentin	VIM	0.512	-	SP-
XRCC6_HUMAN	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6	0.372	-	NS

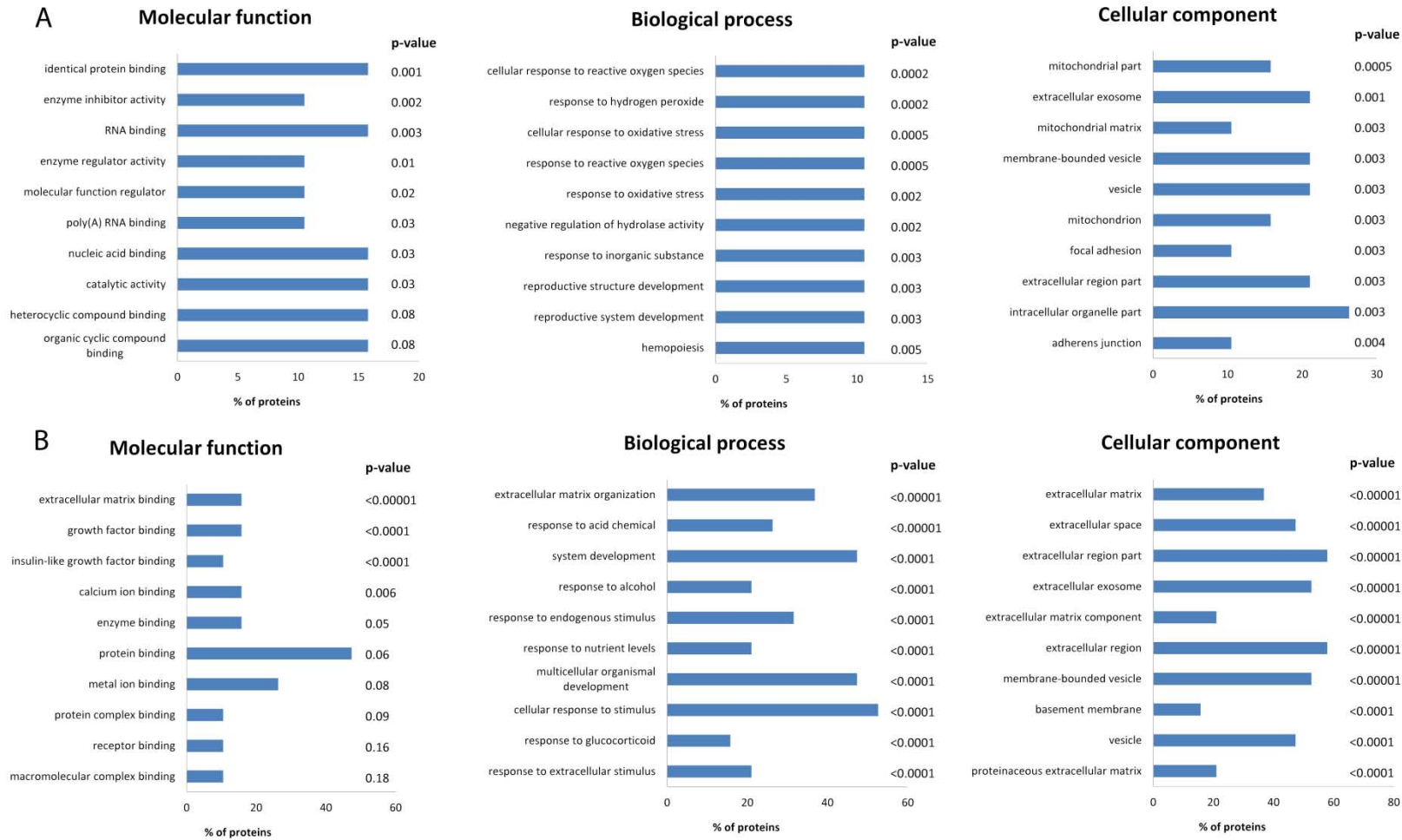
Proteins that showed a differential secretion between OGD and normoxia/normoglycemia conditions (fold change $>|1.4|$) are highlighted in bold.

SP+: secreted protein with signal peptide (classical secretory pathway) (SignalP positive); SP-: secreted protein without signal peptide (non-classical secretory pathway) (SecretomeP score above 0.5); NS: non-secreted proteins.

Supplemental figure 1: Functional classification of the 117 identified proteins in the secretome of hCMEC/D3 cells based on Gene Ontology annotation terms. A) shows proteins over-secreted after OGD; B) shows proteins under-secreted after OGD. GO terms are sorted regarding association p-values corrected by FDR (*y axis*) and % of proteins in each GO term are indicated (*X axis*).



Supplemental figure 2: Functional classification of the 19 differentially secreted proteins identified and quantified (fold change $>|1.4|$) in the secretome of hCMEC/D3 cells based on Gene Ontology annotation terms. A) proteins over-secreted after OGD; B) proteins under-secreted after OGD. GO terms are sorted regarding association p-values (*y axis*) and % of proteins in each GO term are indicated (*X axis*).



2) Plasmatic RBP4 and GFAP as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage

([J Neurochem.](#) 2015 Nov 3. doi: 10.1111/jnc.13419.)

ORIGINAL
ARTICLE

Plasmatic retinol-binding protein 4 and glial fibrillary acidic protein as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage

Víctor Llombart,* Teresa García-Berrocó,* Alejandro Bustamante,* Dolores Giralt,* David Rodríguez-Luna,† Marian Muchada,† Anna Penalba,* Cristina Boada,* Mar Hernández-Guillamon* and Joan Montaner*

*Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

†Neurovascular Unit, Department of Neurology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

Abstract

A rapid differentiation of acute ischemic stroke and intracerebral hemorrhage (ICH) is essential for an adequate treatment and to promote a better outcome. Our aim was to identify new plasma biomarkers to differentiate stroke subtypes and to combine their diagnostic ability with other biomarkers already described for this clinical indication.

Plasma samples of ischemic stroke patients (36) and ICH patients (10) were screened using a 177 antibodies library, and 11 showed different concentrations among stroke subtypes ($p < 0.05$), mainly chemokines, growth factors and angiogenic factors. Five proteins were selected for replication in 16 ischemic stroke patients and 16 ICH patients, and retinol-binding protein 4 (RBP4), apolipoprotein B100 and pigment epithelial-derived factor were replicated ($p < 0.05$). These

proteins, together with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and receptor for advanced glycation end product, were tested in 38 ischemic stroke and 28 ICH samples. Finally, RBP4 $>61 \mu\text{g/mL}$ and GFAP $<0.07 \text{ ng/mL}$ showed a specificity of 100% for both subtypes. Moreover, after multivariate logistic regression analysis, RBP4 $>48.75 \mu\text{g/mL}$ (OR_{adj} : 6.09 (1.3–28.57), $p = 0.02$) and GFAP $<0.07 \text{ ng/mL}$ (OR_{adj} : 0.03 (0.003–0.31), $p = 0.003$) resulted in independent predictors of stroke subtype, improving discrimination by 29% ($p < 0.0001$). Both biomarkers might be useful as diagnostic biomarkers to differentiate ischemic stroke and ICH.

Keywords: biomarkers, cerebral ischemia, intracerebral hemorrhage, stroke subtype.

J. Neurochem. (2015) 10.1111/jnc.13419

Stroke represents one of the most important neurological disorders (Mozaffarian *et al.* 2015). Of all strokes, approximately 85% are ischemic strokes (IS) caused by an arterial occlusion, whereas the remaining 15% are intracerebral hemorrhages (ICH) resulting from an arterial rupture.

In hyper acute phases of stroke diagnosis, the discrimination between both stroke subtypes is essential as there are clear differences in patient management. The primary therapy for acute IS consists of the administration of intravenous tissue plasminogen activator (rt-PA) within the first 4.5 h from symptoms onset (Hacke *et al.* 2008; del Zoppo *et al.* 2009). In selected patients with intracranial arterial occlusions, endovascular therapies aiming to dissolve or remove the clot have also shown efficacy (Berkhemer *et al.* 2015). In contrast, an effective acute treatment for acute ICH is still

Received July 19, 2015; revised manuscript received September 30, 2015; accepted October 9, 2015.

Address correspondence and reprint requests to Dr Joan Montaner, Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain. E-mail: 31862jmv@comb.es

Abbreviations used: APOB100, apolipoprotein B100; APOC-I, apolipoprotein C-I; APOC-III, apolipoprotein C-III; AUC, area under the curve; CI, confidence interval; GFAP, glial fibrillary acidic protein; ICH, intracerebral hemorrhage; IDI, integrated discrimination improvement; IQR, interquartile range; IS, ischemic stroke; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; PEDF, pigment epithelial-derived factor; RAGE, receptor for advanced glycation end product; RBP4, retinol-binding protein 4; ROC, receiver operator characteristics; rt-PA, recombinant tissue plasminogen activator; S100B, S100 calcium-binding protein B; SHBG, sexual hormone-binding globulin; TOAST, trial of org 10172 in acute stroke treatment classification; VEGF, vascular endothelial growth factor.

lacking, although an early intensive lowering of blood pressure seems promising to attenuate absolute hematoma growth (Tsvigoulis *et al.* 2014). A rapid differentiation of both stroke subtypes could allow the initiation of the corresponding treatments in a pre-hospital scenario favoring a better outcome.

Nowadays, stroke subtype diagnosis is mainly based on brain imaging data (Wardlaw *et al.* 2004), but the use of a rapid biomarker-based test might help to speed up the process of stroke subtype diagnosis so that the correct acute treatment can be initiated more quickly. Although pre-hospital acute stroke treatment is becoming a reality (Ebinger *et al.* 2014), its implementation is still limited due to the high resources required for advanced technology elements, such as portable CT scans for IS and ICH differentiation.

During recent years, the use of molecular biomarkers has been considered a potential tool for providing valuable information about the risk, etiology, prognosis and diagnosis of stroke (Kim *et al.* 2013). Different plasma biomarkers have been described to differentiate IS from ICH stroke during the acute phase, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100 calcium-binding protein B (S100B)/receptor for advanced glycation end product (RAGE) or apolipoprotein C-III (APOC-III), some of them showing promising results (Senn *et al.* 2014).

Our aim was to identify new plasma biomarkers to differentiate between acute IS and ICH and to combine their diagnostic ability with other biomarkers already described to differentiate stroke subtypes.

Materials and methods

Study population

All stroke patients retrospectively included in this study were admitted to the emergency department of Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain) from 2003 to 2011. From this cohort, we selected a total number of 144 patients. All of the patients were admitted within 6 h from the onset of symptoms. The local ethical committee approved the study, and written consent was obtained from all patients or relatives in accordance with the Helsinki declaration.

Stroke subtype was diagnosed based on admission brain CT scan reviewed by an expert neuroradiologist blinded to clinical data and biomarker results, using a previously reported standardized protocol (Montaner *et al.* 2008, 2012). Stroke severity was assessed using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) (Brott and Bogousslavsky 2000). Clinical and demographical data were collected blinded to plasma biomarker results.

Samples

Peripheral blood was drawn in EDTA tubes at admission in hospital setting, before any therapeutic measure was applied. Plasma was obtained by centrifugation at 1500 *g* for 15 min at 4°C and stored at -80°C until use. All immunoassays in this study were performed

with plasma samples following manufacturer's instructions and blinded to clinical data.

The experimental design derives from a previous study of our group (García-Berrocoso *et al.* 2014). In the discovery phase, nine plasma pools were obtained from the combination of individual samples of 36 IS patients. Each pool was made up of four individual samples from patients with similar age, NIHSS, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment etiology classification and balanced by gender. Samples were mixed by agitation during 2 h at 4°C. These nine pools were compared with individual plasma samples obtained from 10 patients with ICH as a first exploratory approach.

The following phases of the study were conducted in new individual plasma samples. Sixteen IS patients and 16 ICH patients were included in the first replication phase, and 38 IS patients and 28 ICH patients were included in the second replication phase. IS and ICH patients were similar in age, gender and NIHSS in each phase and between phases. All samples were aliquoted after their obtention and thawed once.

Study phases

- (i) Discovery phase: A library of 177 human proteins (García-Berrocoso *et al.* 2014) was screened with multiplexed sandwich ELISAs from SearchLight® platform (Aushon BioSystems, Billerica, MA, USA).
- (ii) First replication phase: This phase was conducted to validate the results of the most relevant proteins from the discovery phase, in individual samples. Proteins that showed different plasma levels ($p < 0.01$) between IS and ICH were selected from the discovery phase. Sexual hormone-binding globulin (SHBG) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed by ELISA (R&D systems, USA), and apolipoprotein B-100 (APOB100), pigment epithelial-derived factor (PEDF) and retinol-binding protein 4 (RBP4) were analyzed by multiplexed sandwich ELISAs from SearchLight® platform (Aushon BioSystems)
- (iii) Second replication phase: Proteins significantly different among stroke subtypes ($p < 0.05$) were selected from the first replication phase. These proteins were compared with biomarkers from the literature known to differentiate IS from ICH, GFAP (AbNova, Taipei, Taiwan) and RAGE (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

In all phases, each sample was assayed twice and the mean value was used for analyses. When duplicates showed a CV higher than 20%, those samples were excluded from the analysis.

Statistical analysis

SPSS statistical package 15.0 (IBM, Armonk, NY, USA) was used for statistical analysis unless otherwise stated.

Normality was assessed by Shapiro-Wilk test for the discovery phase and Kolmogorov-Smirnov test for the replication phases. For continuous variables, those normally distributed ($p > 0.05$) were analyzed by Student's *t*-test or ANOVA and mean and standard deviation (SD) values are given, whereas for variables with non-normal distribution Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis test was used and median and interquartile range are reported. Intergroup differences were assessed by Pearson's chi-square test for categorical variables. Correlations between biomarkers and clinical continuous variables were analyzed using Pearson's test in normally

distributed variables and Spearman's test in non-normally distributed. Receiver operator characteristics (ROC) curves were used for each biomarker to obtain the cutoff points with optimal accuracy (both sensitivity and specificity) to predict stroke subtype. For those reported cutoff points, we show the prevalence and performed the post-test probabilities analysis with 95% confidence interval (CI) to assess the discrimination improvement (Parshall 2013). Positive test for IS or ICH was calculated as the proportion of patients that showed a biomarkers profile corresponding to each stroke subtype.

In all cases, a $p < 0.05$ was considered significant at a 95% confidence level.

To build predictive models, clinical variables that were associated with stroke subtype at $p < 0.05$ in the univariate analysis together with NIHSS at admission, age and gender were included in a forward stepwise multivariate logistic regression analysis. Afterward biomarkers alone or in combination were added by enter method to clinical predictive models. Odds ratios (ORadj) and 95% CI were given. Moreover, we analyzed the presence of interactions between biomarker levels and clinical variables associated with stroke subtype in the univariate analysis by using Mantel–Haenszel test. Secondary predictive models were built with the biomarkers alone, and the corresponding probabilities were obtained.

The areas under the ROC curve (AUC) from models that include biomarkers and clinical variables were compared with AUC from only clinical model by DeLong's method (DeLong *et al.* 1988) with MedCalc software (version 12.4; MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Using R software v.2.15.0 (Hmisc and PredictABEL packages; R Development Core Team 2012, Vienna, Austria), integrated discrimination improvement (IDI) index was calculated to assess the added value of the biomarkers to the clinical predictive model (Pencina *et al.* 2008; Pickering and Endre 2012).

Results

All demographic and clinical factors from the different studied cohorts are listed in Table S1. A flow chart diagram of the different phases of the study is represented in Fig. 1.

Discovery phase: proteome screening

Among 177 analyzed proteins (Table S2), 11 showed different plasma levels regarding stroke subtypes

($p < 0.05$) (Table 1). The main represented groups are chemokines (27.3%), growth factors (18.2%) and angiogenic factors (18.2%). Five proteins reported the most significant differences between both stroke subtypes. PEDF, APOB100, RBP4 and VEGF were higher in IS than ICH ($p = 0.006$, $p = 0.005$, $p = 0.002$ and $p = 0.007$, respectively). Only SHBG was found to be significantly higher in ICH when compared with IS ($p = 0.009$).

First replication phase

These five candidates were analyzed in an independent cohort of acute IS and ICH patients. Results from the discovery phase for RBP4, APOB100 and PEDF were replicated in this phase. IS stroke patients had higher plasma concentrations of these three proteins ($p = 0.009$, $p = 0.003$ and $p = 0.028$, respectively), whereas no difference was found on levels of SHBG ($p = 0.839$) or VEGF ($p = 0.756$).

Second replication phase

RBP4, APOB100 and PEDF were analyzed in a third cohort. These three candidates were analyzed together with GFAP and RAGE, which are biomarkers previously reported to be associated with ICH and IS, respectively (Foerch *et al.* 2012; Montaner *et al.* 2012). Plasma levels of RBP4 were more elevated in IS when compared with ICH ($56.74 \pm 21.48 \mu\text{g/mL}$ vs. $44.23 \pm 15.04 \mu\text{g/mL}$; $p = 0.011$), while GFAP was significantly higher in ICH (0.075 (0.04 – 0.68) ng/mL vs. 0.04 (0.04 – 0.04) ng/mL ; $p < 0.0001$). We found no differences in plasma concentrations of APOB100 and RAGE between both stroke subtypes (Fig. 2). PEDF results were excluded for further analysis because of high interassay CV.

We determined by means of ROC curves RBP4 and GFAP cutoff points with greater sensitivity and specificity to differentiate IS from ICH. IS patients with RBP4 $>48.75 \mu\text{g/mL}$ and GFAP $<0.07 \text{ ng/mL}$ were differentiated from ICH with a sensitivity = 68.4%, specificity = 84%, positive predictive value (PPV) = 86.7% and negative predictive value (NPV) = 65.6%. Patients with ICH who had RBP4 $<48.75 \mu\text{g/mL}$ and GFAP $>0.07 \text{ ng/mL}$ could be identified with a sensitivity = 32%, specificity = 100%,

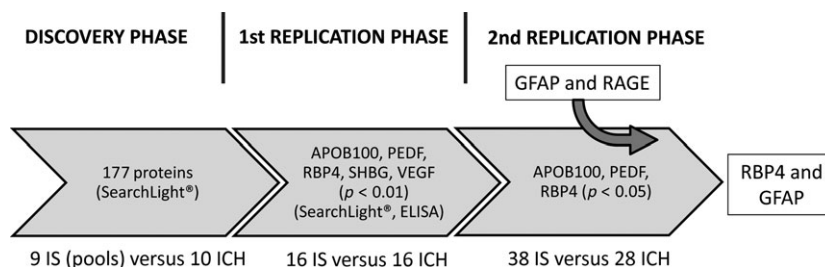


Fig. 1 Flow chart diagram of the different phases of the study. APOB100, apolipoprotein B100; RBP4, retinol-binding protein 4; PEDF, pigment epithelial-derived factor; SHBG, sexual hormone-binding

globulin; VEGF, vascular endothelial growth factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; RAGE, receptor for advanced glycation end product.

Table 1 List of proteins that showed different plasma levels between IS and ICH in the discovery phase

Protein	IS	ICH	<i>p</i> -value	Function
RBP4 $\mu\text{g/mL}$	59.8 \pm 12.32	36.94 \pm 14.68	0.002	Neurotrophic factor
ApoB100 $\mu\text{g/mL}$	506.81 \pm 110.03	349.56 \pm 105.55	0.005	Chemokine
PEDF $\mu\text{g/mL}$	23.82 \pm 3.76	1.69 \pm 5.44	0.006	Hormone
VEGF ng/mL	0.914 (0.86–1.34)	1.21 (0.85–2.36)	0.007	Angiogenic factor
SHBG $\mu\text{g/mL}$	4.17 (3.50–5.75)	7.45 (6.1–9.12)	0.009	Chemokine
I309 pg/mL	1.8 (1.6–2.6)	0.15 (0.15–0.15)	0.01	Chemokine
EGF pg/mL	56.4 (47.1–87.8)	31.95 (14–37.1)	0.011	Growth factor
BMP9 pg/mL	24.3 (20.2–29.6)	14.3 (12.3–17.4)	0.012	Angiogenic factor
CD14 $\mu\text{g/mL}$	2.04 \pm 0.3	2.65 \pm 0.66	0.021	Cell adhesion mol
SCF ng/mL	1.16 \pm 0.24	0.8 \pm 0.38	0.028	Other
CC16 ng/mL	12.62 (9.76–17.34)	7.53 (6.41–12.73)	0.034	Growth factor

APO B100, apolipoprotein B100; BMP9, bone morphogenetic protein 9; CC16, Clara cell secretory protein; CD14, cluster of differentiation 14; EGF, epidermal growth factor; ICH, intracerebral hemorrhage; IS, ischemic stroke; I309, T lymphocyte-secreted protein I-309; PEDF, pigment epithelium-derived factor; RBP4, retinol-binding protein 4; SCF, stem cell factor; SHBG, sexual hormone-binding globulin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

For proteins with normal distribution, mean \pm SD are indicated, whereas for non-normal, median and interquartile range are indicated.

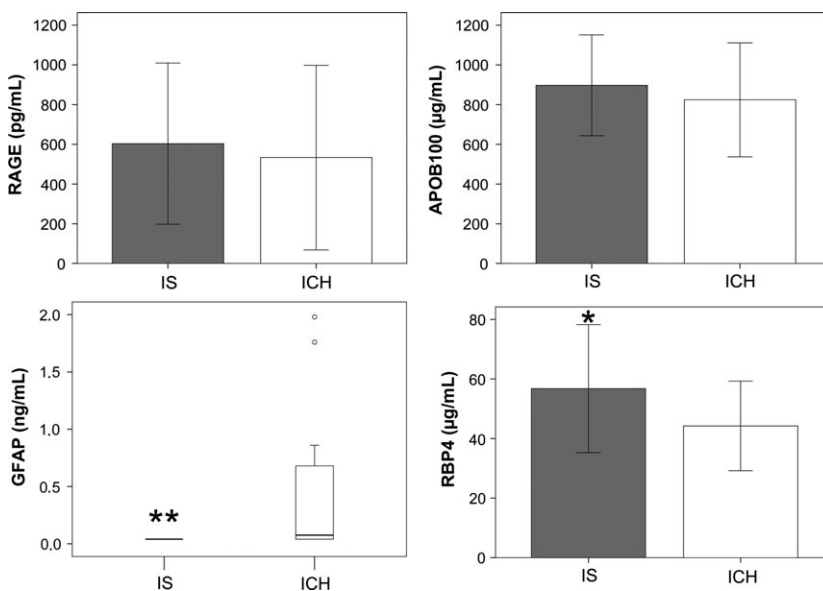


Fig. 2 Plasma levels of RBP4, APOB100, receptor for advanced glycation end product (RAGE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in IS, ischemic stroke (IS) ($n = 38$) and ICH ($n = 28$) patients in the second replication phase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$. For RAGE, APOB100 and RBP4, mean and SD are indicated. For GFAP, median and interquartile range are indicated.

PPV = 100% and NPV = 69.1%. A second cutoff point of RBP4 = 61 $\mu\text{g/mL}$ and GFAP = 0.07 ng/mL showed specificity of 100% for both stroke subtypes (Fig. 3). In post-test analysis, when RBP4 = 48.75 $\mu\text{g/mL}$ and GFAP = 0.07 pg/mL were combined, the detection of true positives was increased, whereas false negatives decreased, compared to the prevalence (Table 2). In comparison with these previous cutoffs, true positives detection of IS patients was increased and false negatives for ICH decreased when we considered a secondary cutoff point of RBP4 = 61 $\mu\text{g/mL}$ combined with GFAP = 0.07 pg/mL (Table 2).

The levels of RBP4 and GFAP were analyzed regarding demographic factors (Table 3). Patients who were hyper-

tensive showed an increase in RBP4 levels ($p = 0.055$) and a decrease of GFAP ($p = 0.005$), which was also shown in patients with coronary artery disease (CAD) ($p = 0.074$).

We performed a logistic regression analysis considering RBP4 and GFAP in the predictive models and probabilities of being IS or ICH were obtained. The logistic regression analysis showed RBP4 >48.75 $\mu\text{g/mL}$ and GFAP <0.07 pg/mL as significant predictors of stroke subtype (RBP4 OR = 5.29 (1.37–20.48) 95% CI, $p < 0.05$; GFAP OR = 0.022 (0.002–0.202) 95% CI, $p < 0.01$; considering IS as endpoint). When we considered RBP4 >61 $\mu\text{g/mL}$ and GFAP <0.07 pg/mL, we could correctly classify 34.2% of IS

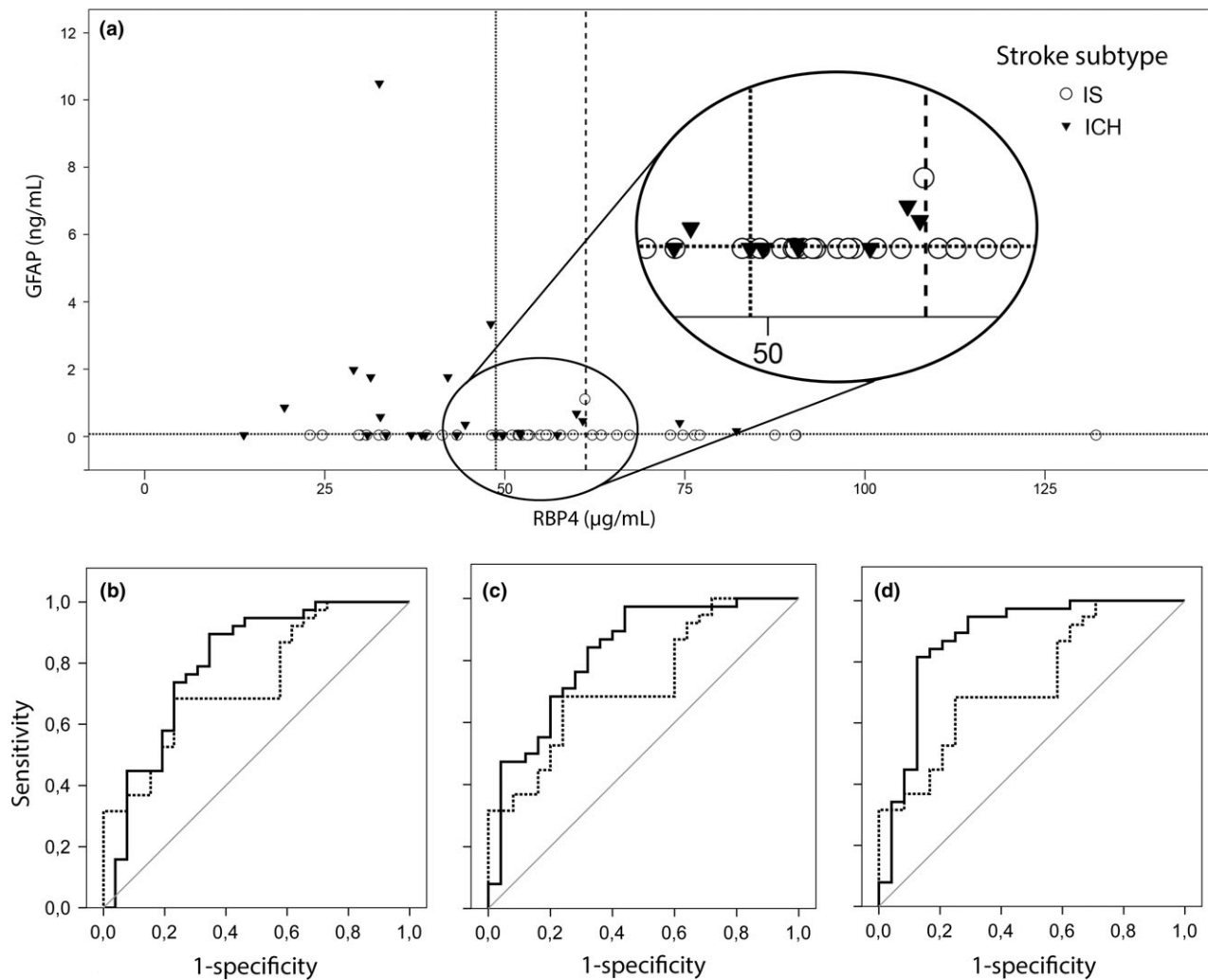


Fig. 3 (a) Dot plot showing patients' distribution according to RBP4 and GFAP plasma levels. (Pointed lines indicate cutoff points of RBP4 = 48.75 and GFAP = 0.07; dashed lines indicate RBP4 = 61.) (b) Receiver operator characteristics (ROC) curve comparison between clinical predictive model and clinical predictive model with RBP4 >48.75. (c) ROC curve comparison between clinical predictive

model and clinical predictive model with GFAP <0.07. (d) ROC curve comparison between clinical predictive model and clinical predictive model with RBP4 >48.75 and GFAP <0.07. (Dashed lines correspond to clinical predictive model; grey lines corresponds to a reference line.) GFAP, glial fibrillary acidic protein; IS, ischemic stroke; ICH, intracerebral hemorrhage; RBP4, retinol-binding protein 4.

and 44% of ICH showing probabilities of >90% for being IS/ICH. In addition, although 65.8% of IS and 56% of ICH patients were unpredicted, no patient was misclassified. Although thus far no clinical model has reported its usefulness for stroke subtype prediction in an emergency department, we developed logistic predictive models that included the clinical variables that appeared significant after the univariate analysis (Table 4), together with basic demographic variables such as age, gender and NIHSS. When RBP4 >48.75 µg/mL and GFAP <0.07 pg/mL were added to this clinical predictive model, they appeared as independent predictors of stroke subtype, and in addition they increased the model's discrimination ability based on the area under the ROC curve (AUC = 0.875, 95% CI (0.773–0.977),

$p = 0.03$) (Fig. 3) and on IDI index (IDI index 29%, $p < 0.0001$) (Table S3).

Discussion

In this study, we describe, for the first time, the identification and validation of RBP4 as a promising biomarker to distinguish IS from ICH during the acute phase of stroke. In addition, we demonstrate that when complemented with GFAP, the discrimination of both stroke subtypes is improved.

RBP4 is a lipocalin that delivers retinol (vitamin A) from the liver to peripheral tissues (Quadro *et al.* 1999). In the brain, retinol is oxidized to its active metabolite, retinoic acid

Table 2 Pre-test and post-test probabilities for IS and ICH when RBP4 = 61 µg/mL or RBP4 = 48.75 µg/mL and GFAP = 0.07 µg/mL cutoff points were considered

	IS identification (%)		ICH identification (%)	
	IS with positive test [95% CI]	IS with negative test [95% CI]	ICH with positive test [95% CI]	ICH with negative test [95% CI]
Prevalence (%)	60	60	40	40
Post-test probabilities				
GFAP = 0.07 µg/mL	74 (59.7–85.4)	7.1 (0.2–33.8)	92.9 (66.1–99.8)	26 (14.6–42.2)
RBP4 = 48.75 µg/mL	75 (57.8–87.9)	38 (57.7–20.7)	62 (42.3–79.3)	25 (42.2–12.1)
RBP4 = 61 µg/mL	87.5 (61.7–98.5)	50 (34.4–63.7)	50 (36.3–65.6)	12.5 (1.6–38.4)
RBP4 = 48.75 µg/mL	87.7 (69.3–96.2)	36.4 (20.4–54.9)	100 (63.1–100)	31 (19.1–44.8)
GFAP = 0.07 µg/mL				
RBP4 = 61 µg/mL	100 (75.3–100)	50 (35.5–64.5)	100 (71.5–100)	26.9 (15.7–41)
GFAP = 0.07 µg/mL				

GFAP, glial fibrillary acidic protein; ICH, intracerebral hemorrhage; IS, ischemic stroke; RBP4, retinol-binding protein 4.

Percentage indicates the proportion of IS or ICH patients in each condition (column), and number in brackets indicates the confidence interval.

and assumes an important role in neurogenesis and neuroplasticity during both CNS development and adult brain function (Plane *et al.* 2008; Shearer *et al.* 2012). Moreover, retinoic acid may act as an anti-apoptotic agent and has been found to reduce cerebral ischemic injury by regulating inflammation (Harvey *et al.* 2004; Choi *et al.* 2009). Circulating RBP4 levels have been found to be increased in subjects with type 2 diabetes (Abahusain *et al.* 1999; Yang *et al.* 2005; Graham *et al.* 2006; Takebayashi *et al.* 2007; Kotnik *et al.* 2011). In our cohort, however, we did not find any difference in RBP4 levels regarding the presence of diabetes. RBP4 has also been positively correlated with subclinical atherosclerosis (Xiao *et al.* 2013) and found to be elevated in patients with established carotid atherosclerosis when compared with controls, which suggests an atherogenic role of RBP4 (Kadoglou *et al.* 2014). To date, and to the best of our knowledge, only one study evaluated the levels of RBP4 in the context of ischemic stroke (Sasaki *et al.* 2010) and found increased RBP4 circulating levels in patients with cerebral infarction compared with healthy controls. However, it is still unclear if RBP4 levels are increased prior to brain ischemic injury or rather this increase appears as a consequence.

Several biomarkers have been previously described to differentiate both stroke subtypes. APOC-I and APOC-III were identified and validated to discriminate between IS and ICH in acute phase (Allard *et al.* 2004). In a previous study from our group conducted in a cohort of 915 stroke patients, we found significantly different levels of S100B and RAGE between ICH and IS, which showed sensitivity = 22.7%, specificity = 80.2%, PPV = 17.1% and NPV = 85.2% (Montaner *et al.* 2012). Other markers of glial damage similar to S100B have also been evaluated to differentiate stroke subtypes. GFAP has been shown as an hyperacute ICH-specific protein that showed the highest specificity

reported to date to differentiate ICH from IS during hyperacute phase after stroke (sensitivity = 84%, specificity = 96%, PPV = 84.2% and NPV = 96.3%) (Foerch *et al.* 2012).

In the present study, we selected GFAP and RAGE to complement RBP4 in the identification of stroke subtype. Regarding RAGE, we found higher levels in IS than ICH patients, although the difference was not significant. Thus, we did not replicate our previous results (Montaner *et al.* 2012) probably because of the smaller number of patients included in our present study. In contrast, here we report significant differences in GFAP levels among stroke subtypes and, in addition, we show that its combination with RBP4 results in a dramatic increase of specificity and PPV, reaching 100%, in the identification of ICH and IS during the first hours after stroke. This high specificity is reflected in the post-test probabilities when the two biomarkers combined reported very few to no false positives. Due to the clear divergences between acute treatments of IS and ICH, a specificity of 100% would be greatly preferable than a high sensitivity at this pre-hospital stage, as wrong treatment is worse than no treatment. The predictive model composed by the combination of GFAP and RBP4 also reported probabilities of >90% for being IS or ICH in a considerable percentage of patients. If validated in greater cohorts, this highly specific combination of RBP4 and GFAP in a panel would be essential in the context of hyperacute management of stroke, mainly in the pre-hospital setting when neuroimaging is not widely available, as a rapid diagnostic would allow the emergency service staff to initiate the most suitable acute therapy. The idea of a panel of biomarkers indicative of complex diseases such as stroke is being consolidated, as the information from several biomarkers that are specific for different processes or mechanism complement each other better. Our results are aligned with this concept, showing that

Table 3 Levels of circulating RBP4 and GFAP regarding demographic factors of patients from the second replication phase

	Frequency <i>n</i> (%)	Baseline RBP4 levels by presence of the indicated factor			Baseline GFAP levels by presence of the indicated factor		
		Yes	No	<i>p</i>	Yes	No	<i>p</i>
Qualitative data							
Gender (Female)	28 (42.4)	51.8 ± 19	51.4 ± 20.9	0.94	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.23)	0.17
Hypertension	45 (68.2)	54.8 ± 21	44.7 ± 15.7	0.055	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.63)	0.005
Dyslipidemia	14 (21.5)	50.7 ± 17.3	50.2 ± 17.5	0.92	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.11)	0.12
Diabetes mellitus	21 (31.8)	50.8 ± 22.5	51.9 ± 18.8	0.84	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.68
Previous stroke	6 (10.2)	60.7 ± 49.9	51.1 ± 17.1	0.73	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.251
Atrial fibrillation	18 (27.3)	53.8 ± 13.9	50.7 ± 21.9	0.58	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.88
Smokers	5 (7.6)	45.9 ± 8.8	52 ± 20.6	0.52	0.04 (0.04–0.35)	0.04 (0.04–0.04)	0.51
CAD	10 (15.2)	58.6 ± 32.5	20.3 ± 16.8	0.45	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.11)	0.074
Ischemic stroke	38 (57.6)	56.74 ± 21.48	44.23 ± 15.04	0.01	0.04 (0.04–0.04)	0.075 (0.04–0.68)	<0.0001
TOAST							
Atherothrombotic	6 (15.8)	66.66 ± 39.15	50 ± 16.74	0.35	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.35
Cardioembolic	13 (34.2)	54.49 ± 16.26	57.92 ± 23.98	0.65	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.72
Lacunar	4 (10.5)	58.3 ± 29.8	51.1 ± 19.4	0.49	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.46
Undetermined	15 (15.5)	54.31 ± 14.19	50.72 ± 21.41	0.55	0.04 (0.04–0.04)	0.04 (0.04–0.16)	0.02
Hematoma localization							
Lobar	17 (73.9)	46.88 ± 14	36.5 ± 14	0.134	0.075 (0.04–0.35)	0.04 (0.04–0.57)	0.827
Quantitative data							
Age	74.56 ± 11		R = 0.02	0.99	74.56 ± 11	R = -0.121	0.34
Admission NIHSS	13.78 ± 7.11		R = 0.101	0.43	13.78 ± 7.11	R = 0.122	0.34
SBP, mmHg	149.28 ± 27.7		R = 0.08	0.97	149.28 ± 27.7	R = 0.071	0.7
DBP, mmHg	79.59 ± 18.2		R = 0.05	0.98	79.59 ± 18.2	R = 0.134	0.46
Glucose, mg/dL	146.79 ± 43.68		R = 0.121	0.5	146.79 ± 43.68	R = 0.215	0.23

Levels of RBP4 and GFAP regarding each demographic and clinical factor analyzed in patients from the second replication phase. Those variables normally distributed are expressed as mean ± SD, and those non-normally distributed were described as median (IQR). Frequency shows the number of patients that present the specified condition (*n*) and the percentage that represent (%).

CAD, cardiac artery disease; DBP, diastolic blood pressure; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment classification; SBP, systolic blood pressure; RBP4, retinol-binding protein 4.

the simultaneous combination of biomarkers, each one specific for one stroke subtype, might allow a better prediction than one single biomarker. However, the development of future panels with complementary biomarkers that might aid in the increase of sensitivity would be desirable.

Apart from RBP4, we found significant differences regarding circulating APOB100 among stroke subtypes in the discovery and the first validation phase. APOB100 is found mainly in low density lipoprotein (LDL) but also in very low density lipoprotein (VLDL) particles (Cromwell and Barringer 2009). This form of apolipoprotein-B is essential for VLDL assembly and secretion from the liver and high levels in plasma are strongly correlated with the appearance of atherosclerosis (Fisher 2012). Unfortunately, APOB100 results could not be replicated in the second validation phase, suggesting its appearance as a false positive.

Despite the strengths of our study, we are aware of some limitations. The discovery phase of the present study derives from a previous independent study (García-Berrocó et al. 2014), and thus the initial phase was developed as an initial

exploration in which different types of samples were compared (pooled vs. individual). This fact might introduce some bias in the initial analysis. Besides, the results obtained in the discovery phase were not corrected for multiple testing, as we considered this phase merely exploratory. Therefore, we obtained some false positives markers that were not replicated in subsequent replication phases. Apart from that, our replication cohorts are relatively small, thus our suggested cutoff points may vary in future studies with larger populations. Furthermore, we defined secondary cutoff points that reported a specificity and PPV of 100%. This impeded the development of predictive models based on these secondary cutoff points due to great imbalance between the predicted stroke subtypes.

An extension of our study is currently under development with a combination of RBP4 and GFAP with other stroke subtype-specific biomarkers. The temporal profile analysis of candidates in times <6 h might also be of interest in order to explore whether differences in plasma biomarker levels are sustained over the first hours after stroke.

Table 4 Univariate analysis with the cohort of the second replication phase

Variable	IS patients (n = 38)	ICH patients (n = 28)	p
Gender (female) n (%)	20 (52.6)	11 (39.3)	0.107
Age	72.28 ± 11.57	76.03 ± 10.98	0.2
Previous stroke, n (%)	4 (10.5)	0 (0)	0.286
Hypertension, n (%)	31 (81.6)	12 (48)	0.005
Diabetes, n (%)	12 (31.6)	9 (36)	0.716
Smokers, n (%)	2 (5.3)	3 (12)	0.377
Atrial fibrillation, n (%)	13 (34.2)	4(16)	0.111
CAD, n (%)	10 (26.3)	0 (0)	0.004
Dyslipidemia, n (%)	11 (29.7)	3 (12)	0.101
NIHSS	14.13 ± 8.37	13.95 ± 6.35	0.925

CAD, cardiac artery disease; ICH, intracerebral hemorrhage; IS, ischemic stroke; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale.

Those factors highlighted in bold showed statistically significant differences between IS and ICH ($p < 0.05$) and were included in the logistic regression analysis. Those variables normally distributed are expressed as mean ± SD, and those non-normally distributed were described as median (IQR).

Future studies would include the validation of these biomarkers in large multicentric cohorts, with samples obtained in the pre-hospital scenario where a rapid decision could be taken and mimicking conditions could be considered such as seizures, epilepsy or migraine.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) and is partially funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PII1/00176). V. Llombart is supported by a predoctoral fellowship from Vall Hebron Institute of Research. Dr Bustamante is supported by a Rio Hortega contract CM/00265 from the Instituto de Salud Carlos III. Authors V.L and J.M are inventors of the European patent with number EP14382492, which include the biomarkers discovered in this study. All other authors declare no conflicts of interest.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1. Demographic factors of cohorts included in the study.

Table S2. SearchLight® protein library list (from Garcia-Berrococo 2014).

Table S3. Comparison between predictive models including clinical variables and RBP4>48.75 and GFAP<0.07.

References

- Abahusain M. A., Wright J., Dickerson J. W. and de Vol E. B. (1999) Retinol, alpha-tocopherol and carotenoids in diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53**, 630–635.
- Allard L., Lescuyer P., Burgess J., Leung K.-Y., Ward M., Walter N., Burkhard P. R., Corthals G., Hochstrasser D. F. and Sanchez J.-C. (2004) ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics* **4**, 2242–2251.
- Berkhemer O. A., Fransen P. S. S., Beumer D. *et al.* (2015) A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **372**, 11–20.
- Brott T. and Bogousslavsky J. (2000) Treatment of acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **343**, 710–722.
- Choi B.-K., Kim J.-H., Jung J.-S., Lee Y.-S., Han M.-E., Baek S.-Y., Kim B.-S., Kim J.-B. and Oh S.-O. (2009) Reduction of ischemia-induced cerebral injury by all-trans-retinoic acid. *Exp. Brain Res.* **193**, 581–589.
- Cromwell W. C. and Barringer T. A. (2009) Low-density lipoprotein and apolipoprotein B: clinical use in patients with coronary heart disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **11**, 468–475.
- DeLong E. R., DeLong D. M. and Clarke-Pearson D. L. (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* **44**, 837–845.
- Ebinger M., Winter B., Wendt M. *et al.* (2014) Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 1622–1631.
- Fisher E. A. (2012) The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 778–781.
- Foerch C., Niessner M., Back T. *et al.* (2012) Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin. Chem.* **58**, 237–245.
- García-Berrococo T., Giralt D., Bustamante A., Llombart V., Rubiera M., Penalba A., Boada C., Espadaler M., Molina C. and Montaner J. (2014) Role of beta-defensin 2 and interleukin-4 receptor as stroke outcome biomarkers. *J. Neurochem.* **129**, 463–472.
- Graham T. E., Yang Q., Blüher M. *et al.* (2006) Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2552–2563.
- Hacke W., Kaste M., Bluhmki E. *et al.* (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1317–1329.
- Harvey B. K., Shen H., Chen G.-J., Yoshida Y. and Wang Y. (2004) Midkine and retinoic acid reduce cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation in rats. *Neurosci. Lett.* **369**, 138–141.
- Kadoglou N. P. E., Lambadiari V., Gastouniotti A. *et al.* (2014) The relationship of novel adipokines, RBP4 and omentin-1, with carotid atherosclerosis severity and vulnerability. *Atherosclerosis* **235**, 606–612.
- Kim S. J., Moon G. J. and Bang O. Y. (2013) Biomarkers for stroke. *J. Stroke* **15**, 27–37.
- Kotnik P., Fischer-Posovszky P. and Wabitsch M. (2011) RBP4: a controversial adipokine. *Eur. J. Endocrinol.* **165**, 703–711.
- Montaner J., Perea-Gainza M., Delgado P., Ribó M., Chacón P., Rosell A., Quintana M., Palacios M. E., Molina C. A. and Alvarez-Sabín J. (2008) Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke* **39**, 2280–2287.

- Montaner J., Mendioroz M., Delgado P. *et al.* (2012) Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J. Proteomics* **75**, 4758–4765.
- Mozaffarian D., Benjamin E. J., Go A. S. *et al.* (2015) Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **131**, e29–e322.
- Parshall M. B. (2013) Unpacking the 2×2 table. *Heart Lung* **42**, 221–226.
- Pencina M. J., D’Agostino R. B., D’Agostino R. B. and Vasan R. S. (2008) Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat. Med.* **27**, 157–172; discussion 207–212.
- Pickering J. W. and Endre Z. H. (2012) New metrics for assessing diagnostic potential of candidate biomarkers. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 1355–1364.
- Plane J. M., Whitney J. T., Schallert T. and Parent J. M. (2008) Retinoic acid and environmental enrichment alter subventricular zone and striatal neurogenesis after stroke. *Exp. Neurol.* **214**, 125–134.
- Quadro L., Blaner W. S., Salchow D. J., Vogel S., Piantedosi R., Gouras P., Freeman S., Cosma M. P., Colantuoni V. and Gottesman M. E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18**, 4633–4644.
- Sasaki M., Otani T., Kawakami M. and Ishikawa S.-E. (2010) Elevation of plasma retinol-binding protein 4 and reduction of plasma adiponectin in subjects with cerebral infarction. *Metab., Clin. Exp.* **59**, 527–532.
- Senn R., Elkind M. S. V., Montaner J., Christ-Crain M. and Katan M. (2014) Potential role of blood biomarkers in the management of nontraumatic intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc. Dis.* **38**, 395–409.
- Shearer K. D., Stoney P. N., Morgan P. J. and McCaffery P. J. (2012) A vitamin for the brain. *Trends Neurosci.* **35**, 733–741.
- Takebayashi K., Suetsugu M., Wakabayashi S., Aso Y. and Inukai T. (2007) Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2712–2719.
- Tsivgoulis G., Katsanos A. H., Butcher K. S., Boviatsis E., Triantafyllou N., Rizos I. and Alexandrov A. V. (2014) Intensive blood pressure reduction in acute intracerebral hemorrhage: a meta-analysis. *Neurology* **83**, 1523–1529.
- Wardlaw J. M., Keir S. L., Seymour J., Lewis S., Sandercock P. a. G., Dennis M. S. and Cairns J. (2004) What is the best imaging strategy for acute stroke? *Health Technol. Assess.* **8**, iii, ix–x, 1–180.
- Xiao Y., Xu A., Hui X., Zhou P., Li X., Zhong H., Tang W., Huang G. and Zhou Z. (2013) Circulating lipocalin-2 and retinol-binding protein 4 are associated with intima-media thickness and subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *PLoS ONE* **8**, e66607.
- Yang Q., Graham T. E., Mody N., Preitner F., Peroni O. D., Zabolotny J. M., Kotani K., Quadro L. and Kahn B. B. (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356–362.
- del Zoppo G. J., Saver J. L., Jauch E. C. and Adams H. P., Council on behalf of the A. H. A. S. (2009) Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **40**, 2945–2948.

Plasmatic RBP4 and GFAP as biomarkers to differentiate ischemic and hemorrhagic stroke

Víctor Llombart, Teresa García-Berrocoso, Alejandro Bustamante, Dolors Giralt, David Rodríguez-Luna, Marian Muchada, Anna Penalba, Cristina Boada, Mar Hernández-Guillamon, Joan Montaner

Supplementary material

Supplemental table I	91
Supplemental table II	92
Supplemental table III	94

Supplemental Tables

Table I: Demographic factors of cohorts included in the study

Factors	Discovery cohort (N=46)	Replication cohort 1 (N=32)	Replication cohort 2 (N=66)	p
Age, years	73.5 (62.5-81.5)	77 (68-83)	74.56±11	0.001
NIHSS at admission	15.6 ± 4.7	15 ± 6	13.78±7.11	0.24
Sex (female) n (%)	14 (31.1)	18 (56.3)	28 (42.4)	0.087
Smokers n (%)	7 (18.9)	3 (9.4)	5 (7.6)	0.192
Arterial hypertension n (%)	29 (65.9)	21 (65.6)	45 (68.2)	0.935
Diabetes mellitus n (%)	12 (30.8)	6 (18.8)	21 (31.8)	0.394
Dyslipidemia n (%)	15 (38.5)	4 (12.5)	14 (21.5)	0.029
Atrial fibrillation n (%)	13 (33.3)	3 (9.4)	18 (27.3)	0.051
Ischemic cardiopathy n (%)	7 (17.9)	3 (9.4)	10 (15.2)	0.588
Previous stroke n (%)	7 (18.4)	5 (15.6)	5 (8.2)	0.281
Ischemic stroke n (%)	36 (78.3)	16 (50)	38 (57.6)	0.023
TOAST				0.240
Atherothrombotic n (%)	12 (34.3)	3 (9.4)	6 (15.8)	-
Cardioembolic n (%)	13 (37.1)	7 (21.9)	13 (34.2)	-
Undetermined n (%)	10 (28.6)	4 (12.5)	15 (39.5)	-
Lacunar n (%)	-	2 (6.3)	4 (10.5)	-
Hemorrhage etiology				0.269
Amyloid angiopathy n(%)	5 (50)	6 (31.3)	6 (21.4%)	-
Hypertensive hemorrhage n(%)	5 (50)	13 (62.5)	11 (39.3%)	-

List of demographic factors that were analyzed in each cohort included in the study. Those variables normally distributed are expressed as mean ± SD and those non-normally distributed were described as median (IQR).

Table II. SearchLight® protein library list (from Garcia-Berrocso 2014).

Angiogenesis Factors Ang-2 (Angiopoietin 2) BMP-9 (Bone Morphogenetic Protein 9) ER (Epregrulin) FGF basic (Fibroblast Growth Factor basic) Fibronectin HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) HGF (Hepatocyte Growth Factor) KGF (Keratinocyte Growth Factor) PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor AA) PDGF-AB (Platelet-Derived Growth Factor AB) PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor BB) PLGF (Placental Growth Factor) TPO (Thrombopoietin) VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor C) VEGF-D (Vascular Endothelial Growth Factor D) VEGF-R1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1) VEGF-R2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)	Chemokines I-309 IL-8 (Interleukin 8) IP-10 (Interferon gamma-Induced Protein 10 kDa) I-TAC (Interferon-Inducible T-cell Alpha Chemoattractant) Lymphotactin MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) MCP-2 (Monocyte Chemotactic Protein 2) MCP-3 (Monocyte Chemotactic Protein 3) MCP-4 (Monocyte Chemotactic Protein 4) MDC (Macrophage-Derived Chemokine) MIG (Monokine Induced by Gamma Interferon) MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha) MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein 1 beta) MIP-1 δ (Macrophage Inflammatory Protein 1 delta) MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein 3 alpha) MIP-3 β (Macrophage Inflammatory Protein 3 beta) MIP-4/PARC (Macrophage Inflammatory Protein 4) MPIF-1 (Myeloid Progenitor Inhibitory Factor 1) NAP-2 (Neutrophil Activating Peptide 2) RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted) SDF-1 β (Stromal Cell-Derived Factor 1 beta) TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine)	Cytokines IL-1ra (Interleukin 1 Receptor Antagonist) IL-2 (Interleukin 2) IL-3 (Interleukin 3) IL-4 (Interleukin 4) IL-5 (Interleukin 5) IL-6 (Interleukin 6) IL-7 (Interleukin 7) IL-9 (Interleukin 9) IL-10 (Interleukin 10) IL-11 (Interleukin 11) IL-12p40 (Interleukin 12 p40 homodimer) IL-12p70 (Interleukin 12 p70 heterodimer) IL-13 (Interleukin 13) IL-15 (Interleukin 15) IL-16 (Interleukin 16) IL-17A (Interleukin 17A) IL-17E (Interleukin 17E) IL-18 (Interleukin 18) IL-23 (Interleukin 23) M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) MIF (Migration Inhibitory Factor) OPN (Osteopontin) RANKL (Receptor Activator of NF-kB Ligand) TNF α monomer (Tumor Necrosis Factor alpha) TNF α active trimer (Tumor Necrosis Factor alpha) TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) TWEAK (TNF-related and WEAK inducer of apoptosis)
Cell Adhesion Molecules E-Cadherin Endoglin E-Selectin ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule1) ICAM-3 (Intercellular Adhesion Molecule 3) L-Selectin PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) P-Selectin TSP-1 (Thrombospondin-1) TSP-2 (Thrombospondin-2) VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)	Coagulation D-Dimer Fibrinogen PAI-1 Active (Plasminogen Activator Inhibitor 1 Active) PAI-1 Total (Plasminogen Activator Inhibitor 1 Total) Protein C Tissue Factor Thrombomodulin Von Willebrand Factor	Cytokine Receptors CD30/TNFRSF8 (Cluster of Differentiation 30) hSGP130 IL-1RI (Interleukin 1 Receptor I) IL-1RII (Interleukin 1 Receptor II) IL-2Ra (Interleukin 2 Receptor alpha) IL-2R γ (Interleukin 2 Receptor gamma) IL-4R (Interleukin 4 Receptor) IL-6R (Interleukin 6 Receptor) IL-13Ra1 (Interleukin 13 Receptor alpha 1) LIF (Leukemia Inhibitory Factor)
Chemokines BCA-1/CXCL13 (B Cell-Attracting Chemokine) ENA-78 (Epithelial Cell-Derived Neutrophil-Activating Peptide 78) Eotaxin Eotaxin-2/CCL24 Eotaxin-3 Exodus-2/CCL21/SLC GRO α (Growth-Regulated Protein alpha) GRO γ (Growth-Regulated Protein gamma) HCC-4/CCL-16 (Hemofiltrate CC Chemokine 4)	Cytokines CD40L (Cluster of Differentiation 40 Ligand) GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) FasL (Fas Ligand) IFN α (Interferon alpha) IFN γ (Interferon gamma) IL-1 α (Interleukin 1 alpha) IL-1 β (Interleukin 1 beta)	

Supplemental Material Table II (continued)

Cytokine Receptors	OPG (Osteoprotegerin) RANK (Receptor Activator of NF- κ B) TNF-RI (Tumor Necrosis Factor alpha Receptor I) TNF-RII (Tumor Necrosis Factor alpha Receptor II)	Matrix Metalloproteinases	MMP-1 (Matrix Metalloproteinase 1) MMP-2 (Matrix Metalloproteinase 2) MMP-3 (Matrix Metalloproteinase 3) MMP-7 (Matrix Metalloproteinase 7) MMP-8 (Matrix Metalloproteinase 8) MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) MMP-10 (Matrix Metalloproteinase 10) MMP-13 (Matrix Metalloproteinase 13) TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1) TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2)
Growth Factors	AR (Amphiregulin) EGF (Epidermal Growth Factor) EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ErbB2/Her2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) HGH (Human Growth Hormone) IGFBP-1 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1) IGFBP-2 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2) IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3) SCF (Stem Cell Factor) TGF α (Transforming Growth Factor alpha) TGF β 1 (Transforming Growth Factor beta 1) TGF β 2 (Transforming Growth Factor beta 2)	Neurotrophic Factors	β -NGF (Beta Nerve Growth Factor) BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) GDNF (Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor) NT3 (Neurotrophin 3) PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor)
Hormones	Acrp-30 (Adiponectin) CG α (Chorionic Gonadotropin alpha) C-peptide Insulin Leptin NT-proBNP (N-Terminal Prohormone of Brain Natriuretic Peptide) Prolactin Resistin SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) Substance P	Other proteins	α 2-Macroglobulin Apo A-1 (Apolipoprotein A-1) Apo B-100 (Apolipoprotein B-100) sAPP β (soluble Amyloid Precursor Protein beta) Cathepsin-D CC16 (Clara Cell Protein) Clusterin COX-2 (Cyclooxygenase 2) MPO (Myeloperoxidase) NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein A) PD-1 (Programmed Death 1) RBP4 (Retinol Binding Protein 4) SP-C (Surfactant Protein C) SP-D (Surfactant Protein D)
Immune Response	SAA (Serum Amyloid A) BD-2 (Beta Defensin 2) CD14 (Cluster of Differentiation 14) hsCRP (C-reactive protein) IgE (Immunoglobulin E) RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products)		

List of 177 proteins screened in the discovery phase.

Table III. Comparison between predictive models including clinical variables and RBP4>48.75 and GFAP<0.07

After univariate analysis, hypertension and cardiac artery disease (CAD) appeared as the only clinical variables significantly related with IS (p=0.005 for hypertension and p=0.004 for CAD)(Table 4 in the main text). However, hypertension remained as the only clinical variable independently associated with IS after logistic regression analysis and, thus considered in the clinical model. This clinical model was further adjusted by basic clinical variables that included age, gender and NIHSS.

In addition, no interaction with hypertension was found in the association of RBP4 or GFAP and stroke subtype (data not shown).

Model Ischemic Stroke					
		Clinical model	Clinical model+RBP4	Clinical model+GFAP	Clinical model+RBP4+GFAP
Logistic regression (OR adj)	age	1.02 (0.97-1.07), p=0.46	1.03 (0.98-1.009), p=0.29	1.02 (0.96-1.07), p=0.6	1.03 (0.97-1.1), p=0.33
	Gender (female)	0.4 (0.12-1.29),p=0.12	0.4 (0.11-1.44), p=0.163	0.5 (0.13-1.89), p=0.31	0.54 (0.13-2.29), p=0.4
	NIHSS	1.01 (0.94-1.1), p=0.747	0.97 (0.89-1.06), p=0.52	1.04 (0.95-1.14), p=0.36	1 (0.89-1.11), p=0.93
	Hypertension	3.88 (1.22-12.35), p=0.02	3.92 (1.12-13.75), p=0.03	2.44 (0.6-9.88), p=0.21	2.36 (0.53-10.53), p=0.26
	RBP4>48.75	-	5.56 (1.58-19.55), p=0.007	-	6.09 (1.3-28.57), p=0.02
	GFAP<0.07	-	-	0.034 (0.003-0.332), p=0.004	0.03 (0.003-0.31), p=0.003
IDI statistics	IDI events	-	0.06	0.1	0.14
	IDI non-events	-	0.06	0.11	0.16
	IDI	-	0.12 (0.04-0.2)	0.21 (0.09-0.32)	0.29 (0.16-0.42)
	p-value	ref	p<0.001	p=0.003	p<0.0001
ROC curve	AUC	0.737 (0.616-0.858)	0.8 (0.681-0.918)	0.824 (0.716-0.933)	0.875 (0.773-0.977)
	p-value	Ref.	p=0.2913	p=0.0586	p=0.0295

OR_{adj} (95% CI) and p-value are given for all logistic regression models. Biomarkers were added to clinical logistic regression model using cut-off point: RBP4>48.75 µg/mL and GFAP<0.07 ng/mL. IDI: integrated discrimination improvement index (events refer to ischemic stroke and non-events to intracerebral hemorrhages); AUC: Area Under the ROC Curve; area with 95%CI given for each model; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale Clinical model always used as reference model to compare. Statistically significant are highlighted in bold.

5. DISCUSIÓN

El estudio de una enfermedad tan compleja como el ictus supone un gran reto para los investigadores. Por ello defendemos que la complementación de distintas herramientas analíticas permite ahondar en el conocimiento de esta patología y comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos involucrados.

Usando estos principios, esta tesis doctoral aporta nuevos resultados tras la aplicación de distintas técnicas proteómicas en modelos *in-vitro* y modelos *in-vivo* de ictus así como en muestras de pacientes que han sufrido un ictus. Estos nuevos datos evidencian la utilidad de estas estrategias para la detección de biomarcadores candidatos útiles para el diagnóstico de esta patología que además podrían convertirse en futuras dianas terapéuticas.

5.1 Uso de biomarcadores para el diagnóstico del ictus

El interés por la aplicación de biomarcadores para el diagnóstico agudo del ictus ha ido creciendo entre la comunidad científica a lo largo de las últimas décadas (Figura 8).

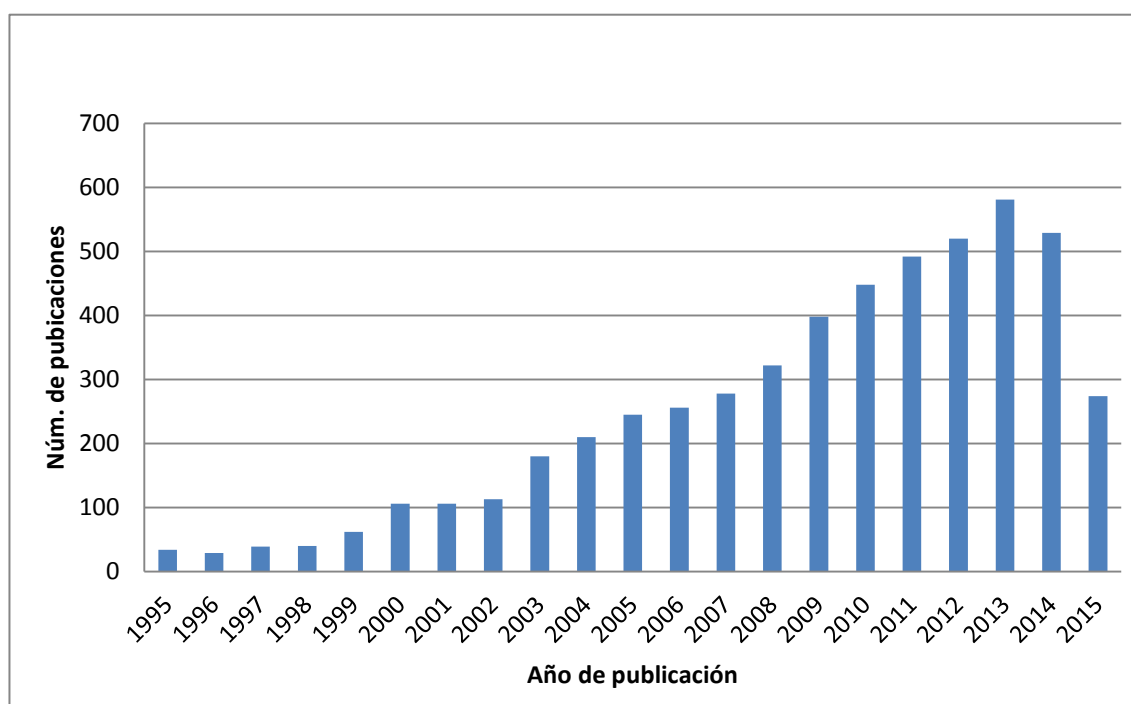


Figura 8. Número de publicaciones por año aplicando *stroke blood biomarker AND diagnosis* como parámetros de búsqueda en la base de datos PubMed

Ante a este notable incremento de la producción científica en nuestra área de interés y con el objetivo de sistematizar la recogida de información disponible sobre biomarcadores diagnósticos del ictus, hemos creado la página <http://stroke-biomarkers.com/>. Tras la búsqueda sistemática en la base de datos pública PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) se seleccionaron todos los estudios en ictus en los que se analizan biomoléculas con indicaciones diagnósticas. La información tanto de los estudios

como de los biomarcadores queda recogida y detallada en la base de datos <http://stroke-biomarkers.com/>. Los criterios de inclusión de biomarcadores consideran que éstos hayan sido analizados en relación al diagnóstico del ictus en cohortes de más de 200 pacientes o en más de 3 estudios independientes, interpretando así que los marcadores descritos (recogidos en la Tabla 4) aportan suficiente evidencia sobre su valor añadido para el diagnóstico del ictus.

La realización de este análisis sistemático de la literatura revela que, en muchos casos, la potencial utilidad clínica de los biomarcadores descritos resulta limitada debido en gran parte al diseño de los estudios. Entrando más en detalle, muchos de ellos incluyen cohortes de pacientes relativamente reducidas, con tiempos de inclusión que sobrepasan la ventana terapéutica o con biomarcadores analizados posteriormente a la obtención de la neuroimagen [67,145–150]. A todo esto, hay que añadir que muchos biomarcadores analizados han demostrado niveles diferenciales entre pacientes con ictus y controles [151–153], pero pocos de ellos se han mostrado capaces de discernir entre el ictus isquémico e ictus hemorrágico [67,86,154,155], o no permiten diferenciar ictus y *mimics*.

En otros casos, los análisis estadísticos aplicados son limitados. Pese a reportar una asociación significativa de un biomarcador, no siempre se evalúa la mejora de la discriminación de los pacientes o la precisión predictiva del modelo [70,71,156]. A todo ello hay que sumar que en algunos casos los biomarcadores analizados no aportan el valor añadido necesario para esta indicación (por ejemplo sensibilidad o especificidad insuficiente).

Para superar todas estas limitaciones se hace necesario consensuar los criterios médicos, prácticos, analíticos y estadísticos a seguir para el diseño de estudios clínicos de gran calidad dirigidos a obtener resultados que resuelvan las cuestiones relevantes en la práctica clínica diaria.

5.2 Análisis mediante distintas aproximaciones proteómicas

En esta tesis doctoral se han utilizado distintas técnicas proteómicas para la cuantificación de analitos. Cada una de ellas presenta ventajas técnicas frente a las otras, pero también limitaciones que hay que tener en cuenta tanto para el diseño experimental como para una correcta interpretación de los resultados obtenidos (Figura 9) [157].

5.2.1 Electroforesis bidimensional acoplada a MS

Pese a haber sido la técnica tradicionalmente más utilizada para llevar a cabo cuantificaciones basadas en MS, el análisis proteómico mediante geles de 2D se ha ido sustituyendo paulatinamente por otras técnicas de cuantificación. A pesar de la capacidad de distinguir

ciertas modificaciones post-traduccionales y distintas isoformas proteicas, la selección manual de *spots*, el limitado rendimiento, el largo tiempo de análisis requerido, la dificultad para su automatización, así como la limitada sensibilidad para proteínas no abundantes ha ido en detrimento de la electroforesis bidimensional acoplada a MS frente a otras técnicas proteómicas [158].

5.2.2 Marcaje SILAC

El desarrollo de estrategias de marcaje isotópico de proteínas y péptidos ha permitido salvar algunas de las limitaciones anteriores. Más concretamente la técnica SILAC, utilizada en el artículo 1 de esta tesis, permite el análisis simultáneo de varias muestras con una gran sensibilidad y reproducibilidad en la cuantificación [159]. Además, como el análisis y la cuantificación de las muestra se realiza de forma simultánea los errores derivados de la manipulación son minimizados. Sin embargo una baja adaptabilidad del modelo *in-vitro* a las condiciones de cultivo requeridas puede limitar la aplicabilidad de esta técnica. El uso de suero dializado, la eliminación de éste durante tiempos de incubación prolongados o una alta conversión arginina-prolina son aspectos a tener en cuenta. También es importante destacar que el proceso de marcaje puede requerir tiempos prolongados para asegurar que éste sea completo y la cuantificación robusta.

5.2.3 MALDI *imaging*

Otra metodología utilizada en esta tesis doctoral (Anexo I) ha sido la técnica MALDI *imaging*, la cual permitió mapear las proteínas en el cerebro sometido a isquemia e identificar algunas de las que podrían estar involucradas en el proceso de isquemia.

A su elevado rendimiento se le suma el hecho que es la única técnica proteómica que proporciona información sobre la distribución espacial de los analitos. Sin embargo, el hecho de ser una técnica de desarrollo relativamente reciente y todavía no consolidada conlleva una serie de limitaciones importantes como son la baja sensibilidad por proteínas mayores de 25 KDa, la dificultad en la automatización y la frecuente imposibilidad de poder llevar a cabo una identificación proteica *in situ*. No obstante, resulta incuestionable el potencial que demuestra la técnica MALDI *imaging* en mejorar el conocimiento de distintas patologías, en ayudar en el diagnóstico y en explorar la distribución tisular de los medicamentos.

Tabla 4. Biomarcadores sanguíneos asociados con el diagnóstico del ictus en más de tres estudios independientes o en al menos 200 pacientes.

Nombre	Función	Descripción	Referencia
D-dímero	Producto de la degradación de la fibrina	Niveles incrementados en ictus isquémicos comparados con pacientes con otras afectaciones neurológicas. Los pacientes con ictus isquémico y hemorrágico no muestran diferencias.	[63,67,86,151,160,161]
Acetilcolinesterasa	Hidroliza la acetilcolina en la unión neuromuscular	Actividad de acetilcolinesterasa incrementada en ictus en comparación con controles.	[145]
Copeptina	Regula la diuresis y la vasoconstricción	Niveles elevados en pacientes con ictus isquémico respecto a controles.	[153]
Proteína C-reactiva	Proteína de fase aguda que promueve la activación del complemento y la fagocitosis	Elevada en pacientes con ictus comparado a controles, y sin diferencias significativas entre ictus isquémico e ictus hemorrágico.	[63,67,146,162-165]
Ferritina	Reguladora de la homeostasis del hierro	Niveles aumentados de ferritina en ictus isquémico comparado con controles.	[166]
S100B	Proteína de unión al calcio expresada principalmente por astrocitos	Mayores niveles en pacientes con ictus comparado con ciertos <i>mimics</i> , y junto con el receptor de productos de la glicación avanzada (RAGE) diferencia ictus isquémicos de ictus hemorrágicos.	[62,63,86,149,152,161,167]
Péptido natriurético tipo B	Hormona cardíaca con función antifibrótica	Niveles más elevados en pacientes con ictus isquémico comparado con <i>mimics</i> y comparado con ictus hemorrágico.	[63,67,86,147,150,161,164,166,168]
Caspasa 3	Activadora de apoptosis	Niveles incrementados en ictus isquémico comparado con pacientes con otras afectaciones neurológicas.	[67,86]
Homocisteína	Aminoácido cuyos niveles se relacionan con daño vascular	No se han observado diferencias entre los niveles de homocisteína entre pacientes con ictus isquémico y controles.	[166]
Proteína ácida fibrilar glial	Forma parte de los filamentos intermedios que constituyen el citoesqueleto celular en astrocitos	Aumentado en ictus hemorrágico comprado con ictus isquémico. Mayores niveles en ictus isquémico que en controles y <i>mimics</i> .	[61,148,152,154,155,167]
Enolasa específica de neurona	Isoforma dominante en neuronas de la enzima enolasa, involucrada en la glicólisis	Niveles plasmáticos elevados en ictus isquémico comparado con ictus hemorrágico y controles. Sus niveles correlacionan con la extensión de la lesión.	[148,149,152,167,169]

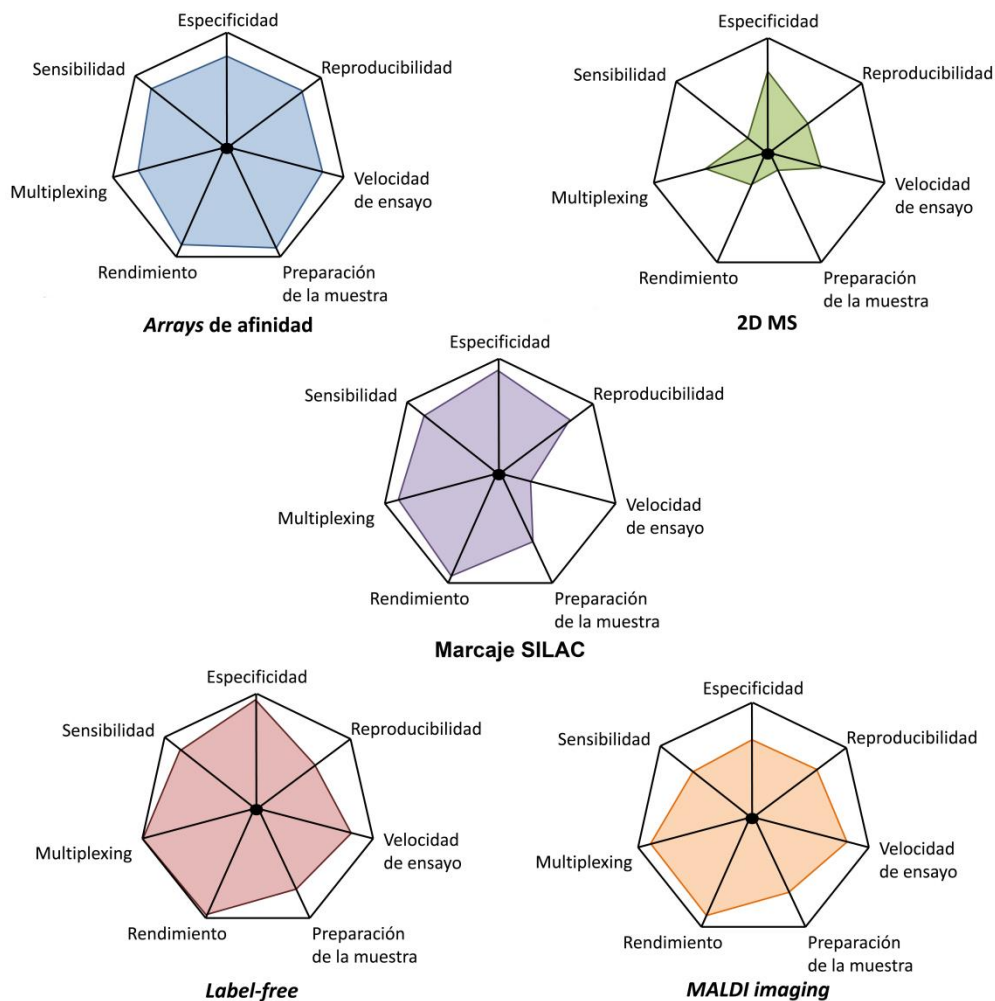


Figura 9: Comparación de las distintas características que ofrecen algunas de las técnicas proteómicas utilizadas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores candidatos de ictus. Adaptada de Hoheisel et al [157]

5.2.4 Cuantificación *label-free*

Gracias a las mejoradas capacidades y al desarrollo de nuevos instrumentos de alta resolución para el análisis por MS, se ha generado un interés creciente en la aplicación de técnicas de cuantificación *label-free* para el descubrimiento de nuevos biomarcadores. En el Anexo II logramos identificar y cuantificar más de 600 proteínas en neuronas y elementos endoteliales de la BBB con más de 2 péptidos, comparando su expresión en distintas regiones cerebrales.

La principal ventaja que presentan estas técnicas es el altísimo rendimiento de análisis y la no limitación en cuanto al número de muestras a comparar en un mismo experimento. Esta última característica permite compensar la reproducibilidad relativamente baja de cuantificación gracias a la posibilidad de analizar un mayor número de muestras biológicas.

Además, aunque siempre dependerá del tipo de muestra a analizar, éstas no requieren una manipulación excesiva ante del análisis por MS. Es importante destacar, que el proceso de

digestión enzimática previa al análisis mediante MS dificulta el poder detectar distintas isoformas o ciertas formas modificadas de las proteínas analizadas, tanto en aproximaciones label-free como en la aplicación de marcajes isotópicos.

5.2.5 Arrays de afinidad

En claro contraste con las técnicas basadas en espectrometría de masas, se encuentran los análisis mediante *arrays* de anticuerpos utilizados en el artículo 2 para el descubrimiento de nuevos biomarcadores candidatos para la diferenciación de los ictus isquémicos y hemorrágicos.

Las principales ventajas que presenta el uso de anticuerpos son su elevada sensibilidad y el reducido procesamiento que requieren las muestras, en comparación con las estrategias basadas en MS. Sin embargo, es importante tener en cuenta la dependencia de estas técnicas en el desarrollo de anticuerpos altamente específicos. Además hay que añadir que para poder combinar distintos anticuerpos para un análisis múltiple en una misma muestra, se debe considerar el gran rango dinámico de las proteínas encontradas en el plasma, pues este hecho puede dificultar el análisis simultáneo de algunas de ellas.

5.3 Aproximaciones *in-vitro* e *in-vivo* para el descubrimiento de nuevos biomarcadores diagnósticos del ictus

5.3.1 Análisis del secretoma celular en un modelo endotelial *in-vitro* de barrera hemato-encefálica

Persiguiendo el objetivo de identificar nuevas proteínas relacionadas con la isquemia cerebral y la disrupción de la BBB hemos caracterizado el secretoma de una línea celular de microvasculatura cerebral humana mediante SILAC. El uso del modelo *in-vitro* basado en células hCMEC/D3 nos ha permitido conocer la respuesta de la microvasculatura cerebral humana frente a un estímulo de privación de oxígeno y nutrientes, simulando la respuesta de las células endoteliales ante a la isquemia cerebral.

A través de esta estrategia fuimos capaces de identificar una serie de proteínas diferencialmente secretadas por el endotelio cerebral tras OGD. Algunas de las proteínas identificadas más relevantes se encuentran involucradas en procesos patológicos relacionados con la isquemia cerebral. Entre ellas identificamos proteínas como *metalloproteinase inhibitor 2* (TIMP2) y *Clusterin* (CLU) que actúan como inhibidores de MMPs, junto con otras que representan parte estructural de la matriz extracelular o que están estrechamente relacionadas en la remodelación y funcionalidad de ésta, como *Biglycan* (BGN), *Collagen alpha-*

2(l) chain (COL1A2), EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (FBLN3) o la proteína SPARC. Otros de los candidatos identificados se encuentran involucrados en el control del estrés oxidativo (PRDX3), la regulación de la apoptosis (ANP32B) o la regulación del crecimiento celular (IGFBP2). No obstante, pese a su implicación en procesos biológicos relevantes en isquemia cerebral, los cambios de concentración detectados en los secretomas no se vieron reflejados en suero de pacientes tras sufrir un ictus. Probablemente la expresión de estas proteínas por parte de otros tipos celulares (p. ej. CLUS por parte de astrocitos) influya en sus niveles circulantes, enmascarando los cambios observados en la secreción por parte de células endoteliales cerebrales.

La disrupción de la BBB durante la isquemia cerebral se encuentra estrechamente relacionada con la aparición de transformaciones hemorrágicas derivadas del tratamiento trombolítico con rt-PA [170]. Tras haber descrito proteínas secretadas por elementos de la BBB durante la privación de oxígeno y glucosa resultaría interesante explorar la posible relación de los candidatos identificados con la aparición de transformaciones hemorrágicas, y evaluar así su papel como potenciales biomarcadores predictores de la aparición de estas temidas complicaciones. En caso de confirmarse esta relación en futuros estudios, estos marcadores ayudarían a identificar aquellos pacientes con alto riesgo de sufrir transformaciones hemorrágicas tras recibir rt-PA, permitiendo así el ajuste óptimo de la terapia trombolítica.

Pese a no haber podido replicar los hallazgos realizados *in-vitro* en muestras de pacientes pensamos que el secretoma celular representa una alternativa atractiva frente a los fluidos biológicos como fuente para identificar potenciales biomarcadores ya que presentan ciertas ventajas. En primer lugar, la exploración de los secretomas mediante técnicas proteómicas permite salvar las enormes diferencias en el rango dinámico que existe en los fluidos biológicos [171]. Además, la caracterización de proteínas contenidas en un subproteoma específico abre la posibilidad a que muchas de las proteínas identificadas puedan ser analizadas posteriormente en sangre a través de técnicas de mayor sensibilidad [172]. En condiciones fisiológicas las proteínas secretadas por las células desarrollan funciones esenciales en la señalización paracelular, comunicación y crecimiento. En un contexto patológico pueden reflejar los diferentes estadios de una enfermedad variando su composición frente a determinados estímulos, permitiendo comprender mejor los mecanismos y vías de señalización involucrados en la respuesta llevada a cabo *in-vivo* [173]. Además, en la mayoría de patologías existe una alteración microambiente extracelular teniendo un efecto sobre la progresión de la patología. Todas estas características convierten el secretoma en un tipo de muestra clínicamente atractiva tanto para el descubrimiento de nuevos biomarcadores

patológicos como dianas moleculares que puedan modular los procesos patológicos involucrados.

5.3.2 Análisis de la distribución y abundancia relativa de proteínas en el tejido cerebral de un modelo *in-vivo* de isquemia cerebral

En claro contraste a los modelos *in-vitro*, se encuentran los modelos *in-vivo*. El uso del propio tejido diana permite la exploración *in situ* de los procesos que se suceden en la isquemia, el análisis de las moléculas involucradas y el descubrimiento de nuevos biomarcadores candidatos. Esta focalización sobre el tejido diana es una estrategia muy extendida en el estudio de multitud de patologías incluido el ictus (ver tabla 2, sección 5.2, Introducción). El análisis de este tipo de muestras permite determinar los cambios globales que aparecen en el órgano diana implicados en la respuesta patológica.

En el Anexo I incluido en esta tesis doctoral se han analizado secciones de cerebro de ratón sometido a isquemia a través de la novedosa técnica MALDI *imaging*. A diferencia del homogeneizado de tejido, en el análisis mediante MALDI *imaging* se mantiene la información espacial, permitiendo estudiar la distribución de las proteínas y realizar su cuantificación relativa directamente sobre el tejido. Mediante el desarrollo de técnicas indirectas, fuimos capaces de identificar las proteínas A2, C2 y B2, las cuales mostraron diferencias sustanciales entre las ROIs comparadas. Estas proteínas aparecen involucradas en la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*) y en el metabolismo de nucleósidos, ambos procesos esenciales para una función neuronal óptima. La implicación de las proteínas identificadas en estos procesos biológicos sugiere su posible papel como potenciales biomarcadores de isquemia cerebral y como posibles dianas para modular el daño neuronal. De hecho algunas estrategias de neuroprotección están dirigidas a modular otros complejos OXPHOS [174] o a incrementar la concentración de los nucleósidos a través de estimular su producción o mediante su administración exógena [175,176].

Con el objetivo de conocer la identidad proteica de los m/z identificados tras el análisis por MALDI *imaging* desarrollamos distintas estrategias de fraccionamiento de la muestra para su posterior análisis *bottom-up*. De forma complementaria, examinamos algunas de las fracciones cromatográficas que contenían m/z de interés. Las fracciones fueron separadas mediante geles de SDS-tricina (16.5%) y las bandas de ~14 and ~22 KDa fueron aisladas y analizadas mediante *peptide mass fingerprint* (PMF). El análisis confirmó las dos bandas aisladas como la isoforma 6 y la isoforma 1 de la proteína MBP (Figura 10). La expresión de las distintas isoformas de MBP (hasta 13 en ratón) se encuentra regulada durante el desarrollo y su localización varía en la

vaina de mielina, aunque su función específica es todavía desconocida [177]. Nuestros hallazgos están en línea con estudios previamente publicados en los que se ha encontrado una expresión disminuida tras la isquemia de la proteína MBP en cerebros de rata y ratón [178,179].

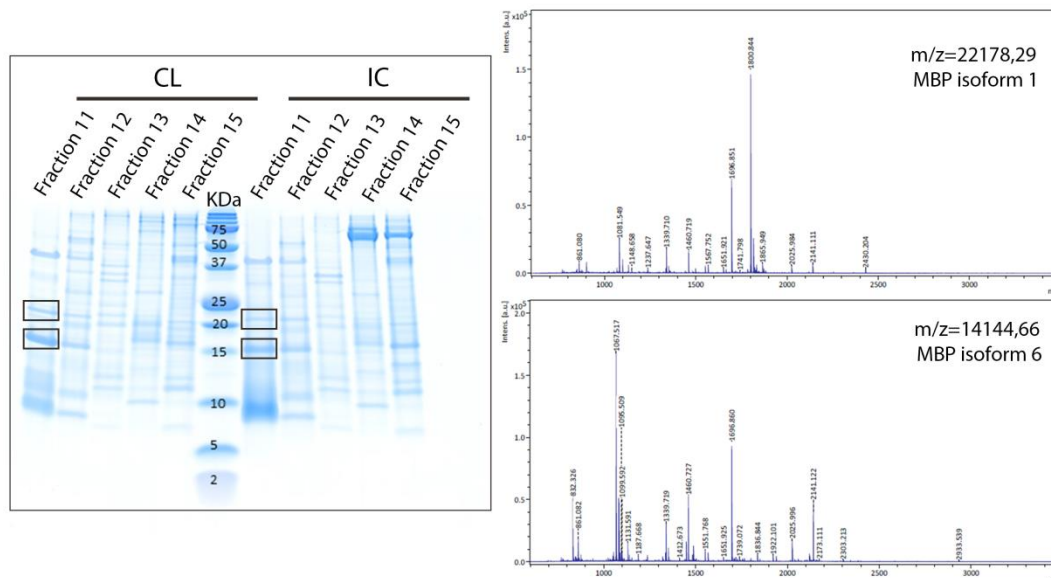


Figura 10: Identificación de las bandas de ~14 y ~22 KDa mediante PMF. Las fracciones 11, 12, 13, 14 y 15 corresponden a los tiempos de retención 26, 26.5, 27, 27.5 y 28 min respectivamente. Las identificaciones fueron confirmadas a través de secuenciación MS/MS de los precursores 1067.517 y 1696.860 para la banda de ~14 KDa, y 1696.851 y 1800.844 para la de ~22 KDa.

CL: contralateral ; IC: infarto

Cabe destacar que la identificación directa de las proteínas examinadas a través de MALDI *imaging* resulta compleja y, a parte de algunas notables excepciones [90,180–183], representa la principal limitación en la aplicación de esta técnica. Esto con frecuencia limita la validación de los resultados e impide elucidar los procesos biológicos involucrados en la patología estudiada. El hecho de haber conseguido conocer la identidad de algunas de las proteínas analizadas representa un claro valor añadido de los resultados obtenidos en el artículo 2. Los resultados de nuestro estudio abren nuevas vías de investigación para futuros estudios en los que analizar el perfil de distribución de proteínas cerebrales en distintos modelos de isquemia que reproduzcan infartos de características específicas. Por ejemplo, el análisis de distintos tiempos de oclusión variable permitiría identificar agentes implicados en la progresión de la lesión y explorar los cambios en su distribución a lo largo del tiempo, incluso en oclusiones breves en las que no se observa lesión tisular aparente pero el tejido se encuentra molecularmente comprometido.

5.3.3 Análisis del proteoma de tipos celulares específicos aislados de infarto y la región contralateral sana de cerebro humano

La obtención de homogeneizado cerebral de distintas regiones de interés se ha utilizado frecuentemente para su posterior análisis mediante técnicas proteómicas ya que permite conocer de forma directa aquellas moléculas implicadas en la patología investigada. No obstante, los estudios en ictus que han desarrollado esta aproximación en muestras humanas son escasos [98,100–102].

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo el análisis de tejido cerebral a través de *label-free* MS mediante una aproximación alternativa a la obtención de homogeneizado total. En el Anexo II se han aislado células microdisecionadas directamente de distintas áreas del parénquima cerebral humano, concretamente somas de neurona y elementos de la BBB. La compleja morfología de algunos componentes de la unidad neurovascular y su estrecha interacción física impide descartar la presencia de tipos celulares como astrocitos o pericitos en las células microdisecionadas. Aun así, esta estrategia ha permitido ahondar en el conocimiento de los procesos moleculares implicados en la respuesta a la isquemia centrando el foco de atención en elementos concretos de la unidad neurovascular conservando la interrelación existente entre sus componentes, cuya respuesta difiere frente al estímulo isquémico.

A través de esta aproximación hemos logrado identificar nuevas proteínas involucradas en la respuesta a la isquemia cerebral y relevantes en poblaciones celulares concretas. El hecho que algunas de estas proteínas se encuentren implicadas en el metabolismo celular ligado a la actividad mitocondrial se halla en concordancia con nuestros resultados derivados del Anexo I.

Tras el análisis por inmunohistoquímica logramos verificar la expresión de A3, B3 y C3. La mayor expresión de B3 en neuronas tras la isquemia podría ser un reflejo de la implicación de esta proteína en la transcripción de cierto factores angiogénicos por parte de las neuronas ([184–186]. En cambio la sobreexpresión de A3 en esta misma población celular tendría relación con su implicación en el control del transporte celular de Ca^{2+} [187]. A pesar de su implicación en procesos claramente asociados a la isquemia cerebral, nuestro estudio relaciona por primera vez B3 y A3 con la patología neurovascular. La expresión de C3, controlador de la concentración intercelular de glutamato, no pudo ser verificada por inmunohistoquímica en elementos de la BBB pero sí en neuronas, replicando resultados anteriores ([188–190].

Ante lo inabarcable que resulta el proteoma total de un organismo, el fraccionamiento en distintos subproteomas permite un estudio más eficaz de cada una de las fracciones generadas

y acceder así a un mayor conocimiento sobre las proteínas que componen un sistema biológico, especialmente aquellas menos abundantes. Gracias a la utilización de una estrategia de cuantificación basada en *gas phase fractionation* (GPF) hemos podido maximizar el rendimiento en el análisis de proteínas de baja abundancia relativa, especialmente en muestras en las que la cantidad de proteína total es limitada, y en las que su fraccionamiento múltiple resulta a menudo inasumible.

5.4 Uso de biomarcadores para diferenciar el ictus isquémico y el ictus hemorrágico

Una rápida diferenciación de los subtipos isquémico y hemorrágico resulta esencial para prescribir el tratamiento agudo adecuado y promover un mejor pronóstico a corto y largo plazo.

Con la finalidad de identificar biomarcadores candidatos capaces de diferenciar entre IS e ICH hemos llevado a cabo dos aproximaciones distintas descritas en el artículo 2 y Anexo III. En el estudio 2 hemos sido capaces de mostrar cómo la combinación de RBP4 y GFAP medidos en sangre logran distinguir ambos subtipos de ictus mediante una estrategia de exploración libre de hipótesis. Tras el cribado masivo de muestras de sangre de pacientes con ictus mediante *arrays* de anticuerpos, y a lo largo de las posteriores fases de confirmación, pudimos dar validez a los niveles diferenciales de RBP4 en ictus isquémico i hemorragia intracerebral. Finalmente RBP4 fue combinado con GFAP en un panel que mostró una elevada especificidad y valor predictivo positivo para la identificación de ambos subtipos de ictus.

Persiguiendo el mismo objetivo, desarrollamos una aproximación hipótesis dirigida en el Anexo III. En él nos servimos de la información derivada del proyecto Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) mediante el cual obtuvimos una lista de biomarcadores candidatos consistente en proteínas específicas de tejido cerebral y de células de la glía. Junto con estos candidatos también identificamos una proteína estructural, NEF3, con capacidad de diferenciar ambos subtipos de ictus. Como resultado pudimos observar cómo la combinación de GFAP, junto con CARNS1, NEF3 y beta-synucleina mejoraba la predicción del subtipo de ictus.

Los escenarios en los que el uso de biomarcadores resultaría más útil para diferenciar ictus isquémico y hemorragia intracerebral, o ictus de *mimics* son aquellos en los que no existe disponibilidad de neuroimagen (MRI o CT). Esta situación se pone de manifiesto en los centros de atención primaria o centros sanitarios de primer y segundo nivel, o en países en vías de

desarrollo donde la accesibilidad a este tipo de pruebas es todavía limitada. Durante la fase pre-hospitalaria, el uso de estos paneles de biomarcadores permitirían acelerar el cribaje de pacientes, previo a su traslado a la unidad de ictus. Aunque existen recientes iniciativas en la que se promueve el uso de escáneres portátiles instalados en ambulancias especializadas (STEMO) [191] el elevado coste económico y los requerimientos tecnológicos necesarios para el uso de estos instrumentos limitan enormemente su uso generalizado en la atención primaria. Ante esta situación, el uso de biomarcadores en fase hiper-aguda puede suponer una valiosa herramienta para el manejo de pacientes.

Generalmente, es preferible que un biomarcador reporte una elevada sensibilidad acompañada por una gran especificidad pero la investigación clínica demuestra que esta situación no es habitual. Parece razonable que la información reportada por un único biomarcador, en una enfermedad tan compleja como el ictus, sea insuficiente para resolver todas las cuestiones clínicamente relevantes en el manejo de los pacientes. Por ello, existe un consenso creciente sobre la idea de desarrollar un panel de biomarcadores que, combinados, sean aplicables para el diagnóstico agudo del ictus con una elevada sensibilidad y especificidad, aportando información a su vez sobre otros aspectos como el pronóstico o la etiología [192].

En esta tesis describimos proteínas candidatas para formar parte de un futuro panel diagnóstico. En publicaciones anteriores se hallan ya descritas diversas proteínas cuyos niveles circulantes difieren entre ambos subtipos de ictus; como por ejemplo la APOC-I, APO C-III, RAGE o S100B [73,86]. No obstante los niveles de sensibilidad y especificidad, reportados únicamente en algunos casos, son moderados (sensibilidad=22.7%, especificidad=80.2%, valor predictivo positivo=17.1% y valor predictivo negativo=85.2%) [86]. GFAP es el único biomarcador que ha mostrado niveles de especificidad mayores del 90% para la detección de ICH en fase aguda [154]. Pese a no haber alcanzado una sensibilidad elevada, mediante la combinación de GFAP con RBP4 o NEF3 en un panel de biomarcadores sí se ha logrado una especificidad superior al 90%, no únicamente para detectar ICH sino también para IS. Esta elevada especificidad permitiría agilizar el diagnóstico en fase pre-hospitalaria, acortando así el tiempo hasta recibir el tratamiento agudo. Al mismo tiempo, un valor predictivo positivo próximo al 100% evita que éste se administre a los pacientes no indicados.

5.5 Futuro de los biomarcadores para el diagnóstico del ictus

Tal y como refleja la expresión “tiempo es cerebro”, cuanto más corto sea el tiempo transcurrido tras sufrir un ictus hasta recibir el tratamiento adecuado, mejor será el pronóstico

del paciente [193]. Siguiendo esta premisa, para que un biomarcador o panel de biomarcadores sean clínicamente útiles para el diagnóstico del ictus deben dar información durante los primeros instantes posteriores al inicio de los síntomas.

Aquellas situaciones en las que la accesibilidad a los equipos de neuroimagen es limitada representan el escenario ideal en el que aplicar el futuro panel de biomarcadores que permita determinar si el ictus que afecta al paciente es de naturaleza isquémica, hemorrágica, o se trata de una patología mimetizante. Estos escenarios incluirían el entorno pre-hospitalario, centros sanitarios de primer y segundo nivel, zonas con baja densidad de población o países en vías de desarrollo. En este contexto, a parte de rapidez, el diagnóstico del ictus requiere una gran especificidad ya que solamente aquellos correctamente identificados podrán recibir el tratamiento adecuado, pues todos los pacientes atendidos serán trasladados con toda probabilidad al centro de salud de referencia donde serán diagnosticados según los procedimientos habituales. Siguiendo este planteamiento se ha publicado recientemente un estudio en el que se determinan los niveles de copeptina en más de 500 pacientes atendidos en la ambulancia STEMO (Stroke Emergency Mobile), equipada con equipo de neuroimagen portátil junto con un laboratorio *point-of-care* [194]. A pesar de no demostrar utilidad la copeptina para el diagnóstico agudo del ictus, el valor añadido del estudio es el hecho de testar el biomarcador en la situación donde sería aplicado, demostrando que su uso es factible y marcando así las bases para el desarrollo de futuros estudios de validación óptimos para biomarcadores dirigidos al diagnóstico del ictus. Un planteamiento similar en futuros estudios que incluyan nuevos candidatos representaría la prueba ideal para evaluar la utilidad diagnóstica de un biomarcador en el ictus.

6. CONCLUSIONES

- 1) La caracterización mediante SILAC de las proteínas secretadas tras la isquemia por parte de nuestro modelo in-vitro compuesto por células de la microvasculatura cerebral, ha permitido identificar nuevas proteínas asociadas a la isquemia y posiblemente involucradas en los procesos de disrupción de la barrera hematoencefálica.
- 2) El uso de la técnica proteómica MALDI *imaging mass spectrometry* ha permitido mapear y comparar la expresión de proteínas en las regiones del infarto y contralateral sanas de cerebro de ratón. Mediante esta aproximación hemos logrado identificar nuevas proteínas como A2, C2 o B2, involucradas en la isquemia cerebral. Futuros estudios determinarán su potencial como biomarcadores para el diagnóstico de esta patología.
- 3) La combinación de la microdissección laser con la cuantificación *label-free* MS ha permitido caracterizar el proteoma de neuronas y elementos de la BBB, y comparar la expresión de proteínas en función del tipo celular y de la región cerebral analizada. Hemos identificado nuevas proteínas implicadas en la respuesta neuronal a la isquemia (A3 o B3), sentando las bases para futuros estudios de neuroprotección o neuroreparación y mostrándolas como posibles candidatas a biomarcador diagnóstico.
- 4) A través del cribado masivo de proteínas circulantes mediante *arrays* de anticuerpos hemos identificado RBP4 como biomarcador plasmático para la diferenciación de ictus isquémico e ictus hemorrágico, en combinación con GFAP. La elevada especificidad y la capacidad de discriminación mostrada por el panel de biomarcadores permitiría su aplicación en fase aguda, agilizando el manejo de los pacientes en situaciones en las que no se dispone de instrumentos de neuroimagen.
- 5) Mediante la combinación de la base de datos pública *Human Protein Atlas*, y el análisis de la familia proteica de los neurofilamentos hemos logrado identificar y testar como biomarcadores proteínas específicas de cerebro y glía. Hemos demostrado la capacidad de las proteínas NEF3, β -syn y CARNS1, en combinación con GFAP, de discriminar con una elevada precisión y especificidad los ictus de naturaleza isquémica, de aquéllos de naturaleza hemorrágica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Díaz-Guzmán, J.-A. Egido, R. Gabriel-Sánchez, G. Barberá-Comes, B. Fuentes-Gimeno, C. Fernández-Pérez, et al., Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study, *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 34 (2012) 272–281. doi:10.1159/000342652.
- [2] Instituto Nacional de Estadística. (Spanish Statistical Office), (n.d.). <http://www.ine.es/> (accessed February 4, 2016).
- [3] D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, et al., Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation.* 133 (2016) 447–454. doi:10.1161/CIR.0000000000000366.
- [4] R.Y.Y. Tan, H.S. Markus, Monogenic causes of stroke: now and the future, *J. Neurol.* 262 (2015) 2601–2616. doi:10.1007/s00415-015-7794-4.
- [5] S. Stankovic, N. Majkic-Singh, Genetic aspects of ischemic stroke: coagulation, homocysteine, and lipoprotein metabolism as potential risk factors, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 47 (2010) 72–123. doi:10.3109/10408361003791520.
- [6] H.P. Adams, B.H. Bendixen, L.J. Kappelle, J. Biller, B.B. Love, D.L. Gordon, et al., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, *Stroke J. Cereb. Circ.* 24 (1993) 35–41.
- [7] A. Arboix, J. Alio, Acute cardioembolic cerebral infarction: answers to clinical questions, *Curr. Cardiol. Rev.* 8 (2012) 54–67.
- [8] GuíaSalud. Clinical Practice Guideline for Primary and Secondary Prevention of Stroke. TEXT, (n.d.). <http://www.guiasalud.es/egpc/traduccion/ingles/ictus/completa/> (accessed February 4, 2016).
- [9] A.I. Qureshi, A.D. Mendelow, D.F. Hanley, Intracerebral haemorrhage, *Lancet Lond. Engl.* 373 (2009) 1632–1644. doi:10.1016/S0140-6736(09)60371-8.
- [10] C.J. van Asch, M.J. Luitse, G.J. Rinkel, I. van der Tweel, A. Algra, C.J. Klijn, Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol.* 9 (2010) 167–176. doi:10.1016/S1474-4422(09)70340-0.
- [11] M. Rodríguez-Yáñez, M. Castellanos, M.M. Freijo, J.C. López Fernández, J. Martí-Fàbregas, F. Nombela, et al., Guías de actuación clínica en la hemorragia intracerebral, *Neurología.* 28 (2013) 236–249. doi:10.1016/j.nrl.2011.03.010.
- [12] Q.T. Wang, S. Tuhim, Etiologies of intracerebral hematomas, *Curr. Atheroscler. Rep.* 14 (2012) 314–321. doi:10.1007/s11883-012-0253-0.

Bibliografia

- [13] J.M. Wardlaw, S.L. Keir, J. Seymour, S. Lewis, P. a. G. Sandercock, M.S. Dennis, et al., What is the best imaging strategy for acute stroke?, *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 8 (2004) iii, ix–x, 1–180.
- [14] P.M. Fernandes, W.N. Whiteley, S.R. Hart, R. Al-Shahi Salman, Strokes: mimics and chameleons, *Pract. Neurol.* 13 (2013) 21–28. doi:10.1136/practneurol-2012-000465.
- [15] L.M. Gibson, W. Whiteley, The differential diagnosis of suspected stroke: a systematic review, *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 43 (2013) 114–118. doi:10.4997/JRCPE.2013.205.
- [16] W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, et al., Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1317–1329. doi:10.1056/NEJMoa0804656.
- [17] Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 1581–1587. doi:10.1056/NEJM199512143332401.
- [18] P.A. Lapchak, Hemorrhagic transformation following ischemic stroke: significance, causes, and relationship to therapy and treatment, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2 (2002) 38–43.
- [19] L. Derex, N. Nighoghossian, Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 79 (2008) 1093–1099. doi:10.1136/jnnp.2007.133371.
- [20] M. Fisher, J.L. Saver, Future directions of acute ischaemic stroke therapy, *Lancet Neurol.* 14 (2015) 758–767. doi:10.1016/S1474-4422(15)00054-X.
- [21] J.L. Saver, M. Goyal, A. Bonafe, H.-C. Diener, E.I. Levy, V.M. Pereira, et al., Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 2285–2295. doi:10.1056/NEJMoa1415061.
- [22] O.A. Berkhemer, P.S.S. Fransen, D. Beumer, L.A. van den Berg, H.F. Lingsma, A.J. Yoo, et al., A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 11–20. doi:10.1056/NEJMoa1411587.
- [23] M. Goyal, A.M. Demchuk, B.K. Menon, M. Eesa, J.L. Rempel, J. Thornton, et al., Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 1019–1030. doi:10.1056/NEJMoa1414905.
- [24] B.C.V. Campbell, P.J. Mitchell, T.J. Kleinig, H.M. Dewey, L. Churilov, N. Yassi, et al., Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 1009–1018. doi:10.1056/NEJMoa1414792.
- [25] G. Tsivgoulis, A.H. Katsanos, Intensive blood pressure reduction in acute intracerebral hemorrhage: A meta-analysis, *Neurology.* 84 (2015) 2464. doi:10.1212/WNL.0000000000001696.

- [26] J.A. Caceres, J.N. Goldstein, Intracranial hemorrhage, *Emerg. Med. Clin. North Am.* 30 (2012) 771–794. doi:10.1016/j.emc.2012.06.003.
- [27] V. Muoio, P.B. Persson, M.M. Sendeski, The neurovascular unit - concept review, *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 210 (2014) 790–798. doi:10.1111/apha.12250.
- [28] N.J. Abbott, A. Friedman, Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease, *Epilepsia*. 53 Suppl 6 (2012) 1–6. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x.
- [29] Y. Terasaki, Y. Liu, K. Hayakawa, L.D. Pham, E.H. Lo, X. Ji, et al., Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 2035–2042.
- [30] O.O. Ogunshola, A. Al-Ahmad, HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability?, *High Alt. Med. Biol.* 13 (2012) 153–161. doi:10.1089/ham.2012.1052.
- [31] R.F. Keep, N. Zhou, J. Xiang, A.V. Andjelkovic, Y. Hua, G. Xi, Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage, *Fluids Barriers CNS.* 11 (2014) 18. doi:10.1186/2045-8118-11-18.
- [32] M.K. Tso, R.L. Macdonald, Subarachnoid hemorrhage: a review of experimental studies on the microcirculation and the neurovascular unit, *Transl. Stroke Res.* 5 (2014) 174–189. doi:10.1007/s12975-014-0323-4.
- [33] X. Chen, A. Deng, T. Zhou, F. Ding, Pretreatment with 2-(4-methoxyphenyl)ethyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-pyranoside attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in vitro and in vivo, *PLoS One*. 9 (2014) e100126. doi:10.1371/journal.pone.0100126.
- [34] H.-T. Lee, Y.-C. Chang, Y.-F. Tu, C.-C. Huang, VEGF-A/VEGFR-2 signaling leading to cAMP response element-binding protein phosphorylation is a shared pathway underlying the protective effect of preconditioning on neurons and endothelial cells, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (2009) 4356–4368. doi:10.1523/JNEUROSCI.5497-08.2009.
- [35] S.D. Appleton, G.E. Lash, G.S. Marks, K. Nakatsu, J.F. Brien, G.N. Smith, et al., Effect of glucose and oxygen deprivation on heme oxygenase expression in human chorionic villi explants and immortalized trophoblast cells, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 (2003) R1453–1460. doi:10.1152/ajpregu.00234.2003.
- [36] A.V. Andjelkovic, S.M. Stamatovic, R.F. Keep, The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (2003) 1348–1355. doi:10.1097/01.WCB.0000091762.61714.FE.
- [37] C. Merino-Zamorano, M. Hernández-Guillamon, A. Jullienne, A. Le Béhot, I. Bardou, M. Parés, et al., NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke, *Stroke J. Cereb. Circ.* 46 (2015) 477–484. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006826.

Bibliografia

- [38] I. Wilhelm, C. Fazakas, I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier, *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)*. 71 (2011) 113–128.
- [39] B.B. Weksler, E.A. Subileau, N. Perrière, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, et al., Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19 (2005) 1872–1874. doi:10.1096/fj.04-3458fje.
- [40] S.M. Carl, D.J. Lindley, D. Das, P.O. Couraud, B.B. Weksler, I. Romero, et al., ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood--brain barrier cell line, hCMEC/D3 [corrected], *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1057–1068. doi:10.1021/mp900178j.
- [41] S. Ohtsuki, C. Ikeda, Y. Uchida, Y. Sakamoto, F. Miller, F. Glacial, et al., Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 289–296. doi:10.1021/mp3004308.
- [42] S. Dauchy, F. Miller, P.-O. Couraud, R.J. Weaver, B. Weksler, I.-A. Romero, et al., Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 897–909. doi:10.1016/j.bcp.2008.11.001.
- [43] B. Poller, H. Gutmann, S. Krähenbühl, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, et al., The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1358–1368.
- [44] Y. Pan, M.J. Scanlon, Y. Owada, Y. Yamamoto, C.J.H. Porter, J.A. Nicolazzo, Fatty Acid-Binding Protein 5 Facilitates the Blood-Brain Barrier Transport of Docosahexaenoic Acid, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 4375–4385. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00580.
- [45] S. Prasad, R.K. Sajja, J.H. Park, P. Naik, M.A. Kaiser, L. Cucullo, Impact of cigarette smoke extract and hyperglycemic conditions on blood-brain barrier endothelial cells, *Fluids Barriers CNS.* 12 (2015) 18. doi:10.1186/s12987-015-0014-x.
- [46] L. Qin, W. Huang, X. Mo, Y. Chen, X. Wu, LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 120641. doi:10.1155/2015/120641.
- [47] M. Hayes, L.F. Moen, M.A.E. Auty, T.E. Lea, Transport of a Prolyl Endopeptidase Inhibitory Peptide across the Blood-Brain Barrier Demonstrated Using the hCMEC/D3 Cell Line Transcytosis Assay, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 146–150. doi:10.1021/acs.jafc.5b04696.
- [48] R.K. Sajja, K.N. Green, L. Cucullo, Altered Nrf2 signaling mediates hypoglycemia-induced blood-brain barrier endothelial dysfunction in vitro, *PloS One.* 10 (2015) e0122358. doi:10.1371/journal.pone.0122358.

- [49] N.V.S.D.K. Bhupathiraju, X. Hu, Z. Zhou, F.R. Fronczek, P.-O. Couraud, I.A. Romero, et al., Synthesis and in vitro evaluation of BBB permeability, tumor cell uptake, and cytotoxicity of a series of carboranylporphyrin conjugates, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6718–6728. doi:10.1021/jm500786c.
- [50] I.M. Macrae, Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1062–1078. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.
- [51] R.J. Traystman, Animal models of focal and global cerebral ischemia, *ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.* 44 (2003) 85–95.
- [52] M.A. Kirkman, S.M. Allan, A.R. Parry-Jones, Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (2011) 2135–2151. doi:10.1038/jcbfm.2011.124.
- [53] W. Whiteley, Y. Tian, G.C. Jickling, Blood biomarkers in stroke: research and clinical practice, *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 7 (2012) 435–439. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00784.x.
- [54] I.N. Mir, L.F. Chalak, Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit, *Early Hum. Dev.* 90 (2014) 707–711. doi:10.1016/j.earlhumdev.2014.06.010.
- [55] A. Bustamante, T. Garcia-Berrocoso, V. Llombart, A. Simats, D. Giralt, J. Montaner, Neuroendocrine hormones as prognostic biomarkers in the setting of acute stroke: overcoming the major hurdles, *Expert Rev. Neurother.* 14 (2014) 1391–1403. doi:10.1586/14737175.2014.977867.
- [56] L.-J. Yang, D.-Q. Ma, H. Cui, Proteomic analysis of immature rat pups brain in response to hypoxia and ischemia challenge, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) 4645–4660.
- [57] N. El Hussein, D.T. Laskowitz, Clinical application of blood biomarkers in cerebrovascular disease, *Expert Rev. Neurother.* 10 (2010) 189–203. doi:10.1586/ern.09.151.
- [58] A. Häggmark, J.M. Schwenk, P. Nilsson, Neuroproteomic profiling of human body fluids, *Proteomics Clin. Appl.* (2015). doi:10.1002/prca.201500065.
- [59] M.B. Jensen, M.R. Chacon, J.A. Sattin, R.L. Levine, R. Vemuganti, Potential biomarkers for the diagnosis of stroke, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 7 (2009) 389–393. doi:10.1586/erc.09.9.
- [60] C.M. Laborde, L. Mourino-Alvarez, F. Akerstrom, L.R. Padial, F. Vivanco, F. Gil-Dones, et al., Potential blood biomarkers for stroke, *Expert Rev. Proteomics.* 9 (2012) 437–449. doi:10.1586/epr.12.33.

Bibliografía

- [61] C. Foerch, I. Curdt, B. Yan, F. Dvorak, M. Hermans, J. Berkefeld, et al., Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 77 (2006) 181–184. doi:10.1136/jnnp.2005.074823.
- [62] S.-Y. Park, M.-H. Kim, O.-J. Kim, H.-J. Ahn, J.-Y. Song, J.-Y. Jeong, et al., Plasma heart-type fatty acid binding protein level in acute ischemic stroke: comparative analysis with plasma S100B level for diagnosis of stroke and prediction of long-term clinical outcome, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115 (2013) 405–410. doi:10.1016/j.clineuro.2012.06.004.
- [63] S.W. Glickman, S. Phillips, K.J. Anstrom, D.T. Laskowitz, C.B. Cairns, Discriminative capacity of biomarkers for acute stroke in the emergency department, *J. Emerg. Med.* 41 (2011) 333–339. doi:10.1016/j.jemermed.2010.02.025.
- [64] S. Sotgiu, B. Zanda, B. Marchetti, M.L. Fois, G. Arru, G.M. Pes, et al., Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia, *Eur. J. Neurol.* 13 (2006) 505–513. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01280.x.
- [65] Y. Miao, J.K. Liao, Potential serum biomarkers in the pathophysiological processes of stroke, *Expert Rev. Neurother.* 14 (2014) 173–185. doi:10.1586/14737175.2014.875471.
- [66] D.T. Laskowitz, S.E. Kasner, J. Saver, K.S. Remmel, E.C. Jauch, BRAIN Study Group, Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study, *Stroke J. Cereb. Circ.* 40 (2009) 77–85. doi:10.1161/STROKEAHA.108.516377.
- [67] J. Montaner, M. Mendioroz, M. Ribó, P. Delgado, M. Quintana, A. Penalba, et al., A panel of biomarkers including caspase-3 and D-dimer may differentiate acute stroke from stroke-mimicking conditions in the emergency department, *J. Intern. Med.* 270 (2011) 166–174. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02329.x.
- [68] E.W. Steyerberg, B. Van Calster, M.J. Pencina, [Performance measures for prediction models and markers: evaluation of predictions and classifications], *Rev. Esp. Cardiol.* 64 (2011) 788–794. doi:10.1016/j.recesp.2011.04.017.
- [69] R. Muller, M. Möckel, Logistic regression and CART in the analysis of multimarker studies, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 394 (2008) 1–6. doi:10.1016/j.cca.2008.04.007.
- [70] B. Grund, C. Sabin, Analysis of biomarker data: logs, odds ratios, and receiver operating characteristic curves, *Curr. Opin. HIV AIDS.* 5 (2010) 473–479. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed742.
- [71] M.J. Pencina, R.B. D’Agostino, R.B. D’Agostino, R.S. Vasan, Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond, *Stat. Med.* 27 (2008) 157–172; discussion 207–212. doi:10.1002/sim.2929.

- [72] K. Stoeck, P. Sanchez-Juan, J. Gawinecka, A. Green, A. Ladogana, M. Pocchiari, et al., Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years, *Brain J. Neurol.* 135 (2012) 3051–3061. doi:10.1093/brain/aws238.
- [73] L. Allard, P. Lescuyer, J. Burgess, K.-Y. Leung, M. Ward, N. Walter, et al., ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke, *Proteomics.* 4 (2004) 2242–2251. doi:10.1002/pmic.200300809.
- [74] A. Panchaud, M. Affolter, P. Moreillon, M. Kussmann, Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook, *J. Proteomics.* 71 (2008) 19–33. doi:10.1016/j.jprot.2007.12.001.
- [75] L. Dayon, N. Turck, T. Garcí-Berrocso, N. Walter, P.R. Burkhard, A. Vilalta, et al., Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1043–1051. doi:10.1021/pr101123t.
- [76] S. Hu, J.A. Loo, D.T. Wong, Human body fluid proteome analysis, *Proteomics.* 6 (2006) 6326–6353. doi:10.1002/pmic.200600284.
- [77] M.H. Maurer, Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF), *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 17–28. doi:10.1002/mas.20213.
- [78] F. Pontén, K. Jirström, M. Uhlen, The Human Protein Atlas--a tool for pathology, *J. Pathol.* 216 (2008) 387–393. doi:10.1002/path.2440.
- [79] L. Ly, V.C. Wasinger, Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: tools for the complex proteome, *Proteomics.* 11 (2011) 513–534. doi:10.1002/pmic.201000394.
- [80] P.M. George, M. Mlynash, C.M. Adams, C.J. Kuo, G.W. Albers, J.-M. Olivot, Novel TIA biomarkers identified by mass spectrometry-based proteomics, *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 10 (2015) 1204–1211. doi:10.1111/ijss.12603.
- [81] N. Rico Santana, E. Zapico Muñoz, D. Cocho, Y. Bravo, R. Delgado Mederos, J. Martí-Fàbregas, Analysis of peptidome profiling of serum from patients with early onset symptoms of ischemic stroke, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 23 (2014) 235–240. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.01.002.
- [82] R. Sharma, H. Gowda, S. Chavan, J. Advani, D. Kelkar, G.S.S. Kumar, et al., Proteomic Signature of Endothelial Dysfunction Identified in the Serum of Acute Ischemic Stroke Patients by the iTRAQ-Based LC-MS Approach, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 2466–2479. doi:10.1021/pr501324n.
- [83] F. Bian, R.P. Simon, Y. Li, L. David, J. Wainwright, C.L. Hall, et al., Nascent proteomes in peripheral blood mononuclear cells as a novel source for biomarker discovery in human stroke, *Stroke J. Cereb. Circ.* 45 (2014) 1177–1179. doi:10.1161/STROKEAHA.113.004576.

Bibliografía

- [84] P. Kodali, A. Jurkevica, J. Landero, C. Kuhlmann, J. Caruso, O. Adeoye, Multiple liquid chromatography separations and nanoESI-ion trap detection of plasma proteins in search of stroke biomarkers: A pilot study, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2153–2161. doi:10.1002/jssc.201200216.
- [85] M.F. Lopez, D.A. Sarracino, A. Prakash, M. Athanas, B. Krastins, T. Rezai, et al., Discrimination of ischemic and hemorrhagic strokes using a multiplexed, mass spectrometry-based assay for serum apolipoproteins coupled to multi-marker ROC algorithm, *Proteomics Clin. Appl.* 6 (2012) 190–200. doi:10.1002/prca.201100041.
- [86] J. Montaner, M. Mendioroz, P. Delgado, T. García-Berrococo, D. Giralt, C. Merino, et al., Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway, *J. Proteomics.* 75 (2012) 4758–4765. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.033.
- [87] P. Huang, L.-H. Lo, Y.-C. Chen, R.-T. Lin, J. Shiea, C.-K. Liu, Serum free hemoglobin as a novel potential biomarker for acute ischemic stroke, *J. Neurol.* 256 (2009) 625–631. doi:10.1007/s00415-009-0133-x.
- [88] J. Zhang, C.-H. Zhang, X.-L. Lin, Q. Zhang, J. Wang, S.-L. Shi, Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for differentiating intracerebral hemorrhage and ischemic stroke in patients with symptoms of acute stroke: a systematic review and meta-analysis, *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 34 (2013) 1887–1892. doi:10.1007/s10072-013-1541-3.
- [89] A. Reddy, H. Wang, H. Yu, T.O. Bonates, V. Gulabani, J. Azok, et al., Logical Analysis of Data (LAD) model for the early diagnosis of acute ischemic stroke, *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 8 (2008) 30. doi:10.1186/1472-6947-8-30.
- [90] E. Martínez-Morillo, P. García Hernández, I. Begcevic, H. Kosanam, B. Prieto García, F.V. Alvarez Menéndez, et al., Identification of novel biomarkers of brain damage in patients with hemorrhagic stroke by integrating bioinformatics and mass spectrometry-based proteomics, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 969–981. doi:10.1021/pr401111h.
- [91] L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, N. Turck, K. Kuhn, D.F. Hochstrasser, et al., Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2921–2931. doi:10.1021/ac702422x.
- [92] C.G. Zimmermann-Ivol, P.R. Burkhard, J. Le Floch-Rohr, L. Allard, D.F. Hochstrasser, J.-C. Sanchez, Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study, *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 3 (2004) 66–72. doi:10.1074/mcp.M300066-MCP200.

- [93] P. Lescuyer, L. Allard, C.G. Zimmermann-Ivol, J.A. Burgess, S. Hughes-Frutiger, P.R. Burkhard, et al., Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration, *Proteomics*. 4 (2004) 2234–2241. doi:10.1002/pmic.200300822.
- [94] K. Suzuyama, T. Shiraishi, T. Oishi, S. Ueda, H. Okamoto, M. Furuta, et al., Combined proteomic approach with SELDI-TOF-MS and peptide mass fingerprinting identified the rapid increase of monomeric transthyretin in rat cerebrospinal fluid after transient focal cerebral ischemia, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 129 (2004) 44–53. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.06.021.
- [95] J. Dawson, M. Walters, C. Delles, H. Mischak, W. Mullen, Urinary proteomics to support diagnosis of stroke, *PloS One*. 7 (2012) e35879. doi:10.1371/journal.pone.0035879.
- [96] D. Brea, J. Agulla, A. Staes, K. Gevaert, F. Campos, T. Sobrino, et al., Study of Protein Expression in Peri-Infarct Tissue after Cerebral Ischemia, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12030. doi:10.1038/srep12030.
- [97] C. Ren, J. Guingab-Cagmat, F. Kobeissy, S. Zoltewicz, S. Mondello, M. Gao, et al., A neuroproteomic and systems biology analysis of rat brain post intracerebral hemorrhagic stroke, *Brain Res. Bull.* 102 (2014) 46–56. doi:10.1016/j.brainresbull.2014.02.005.
- [98] A. Datta, H. Akatsu, K. Heese, S.K. Sze, Quantitative clinical proteomic study of autopsied human infarcted brain specimens to elucidate the deregulated pathways in ischemic stroke pathology, *J. Proteomics*. 91 (2013) 556–568. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.017.
- [99] K. Rosenkranz, C. May, C. Meier, K. Marcus, Proteomic analysis of alterations induced by perinatal hypoxic-ischemic brain injury, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 5794–5803. doi:10.1021/pr3005869.
- [100] E. Cuadrado, A. Rosell, N. Colomé, M. Hernández-Guillamon, T. García-Berrocso, M. Ribo, et al., The proteome of human brain after ischemic stroke, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69 (2010) 1105–1115. doi:10.1097/NEN.0b013e3181f8c539.
- [101] E. Cuadrado, A. Rosell, A. Penalba, M. Slevin, J. Alvarez-Sabín, A. Ortega-Aznar, et al., Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 3191–3197. doi:10.1021/pr801012x.
- [102] T. García-Berrocso, D. Giralt, V. Llombart, A. Bustamante, A. Penalba, A. Flores, et al., Chemokines after human ischemic stroke: From neurovascular unit to blood using protein arrays, *Transl. Proteomics*. 3 (2014) 1–9. doi:10.1016/j.trprot.2014.03.001.
- [103] A. Chen, W.P. Liao, Q. Lu, W.S.F. Wong, P.T.-H. Wong, Upregulation of dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin alpha II chain, heat shock cognate protein

Bibliografía

- 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats--a proteomics approach, *Neurochem. Int.* 50 (2007) 1078–1086. doi:10.1016/j.neuint.2006.11.008.
- [104] X. Xiong, Q. Liang, J. Chen, R. Fan, T. Cheng, Proteomics profiling of pituitary, adrenal gland, and splenic lymphocytes in rats with middle cerebral artery occlusion, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 657–664. doi:10.1271/bbb.80717.
- [105] J.-W. Seo, Y. Kim, J. Hur, K.-S. Park, Y.-W. Cho, Proteomic analysis of primary cultured rat cortical neurons in chemical ischemia, *Neurochem. Res.* 38 (2013) 1648–1660. doi:10.1007/s11064-013-1067-3.
- [106] M. Ning, D.A. Sarracino, A.T. Kho, S. Guo, S.-R. Lee, B. Krastins, et al., Proteomic temporal profile of human brain endothelium after oxidative stress, *Stroke J. Cereb. Circ.* 42 (2011) 37–43. doi:10.1161/STROKEAHA.110.585703.
- [107] A. Datta, J.E. Park, X. Li, H. Zhang, Z.S. Ho, K. Heese, et al., Phenotyping of an in vitro model of ischemic penumbra by iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 472–484. doi:10.1021/pr900829h.
- [108] A.S. Haqqani, J. Kelly, E. Baumann, R.F. Haseloff, I.E. Blasig, D.B. Stanimirovic, Protein markers of ischemic insult in brain endothelial cells identified using 2D gel electrophoresis and ICAT-based quantitative proteomics, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 226–239. doi:10.1021/pr0603811.
- [109] T. Rabilloud, C. Lelong, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial, *J. Proteomics.* 74 (2011) 1829–1841. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.040.
- [110] E.W.Y. Ng, M.Y.M. Wong, T.C.W. Poon, Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications, *Top. Curr. Chem.* 336 (2014) 139–175. doi:10.1007/128_2012_413.
- [111] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4751–4760.
- [112] L.A. McDonnell, R.M.A. Heeren, Imaging mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 606–643. doi:10.1002/mas.20124.
- [113] T.C. Rohner, D. Staab, M. Stoeckli, MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections, *Mech. Ageing Dev.* 126 (2005) 177–185. doi:10.1016/j.mad.2004.09.032.
- [114] J. Pierson, J.L. Norris, H.-R. Aerni, P. Svenningsson, R.M. Caprioli, P.E. Andrén, Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 289–295.
- [115] M. Martin-Lorenzo, B. Balluff, A.S. Maroto, R.J. Carreira, R.J.M. van Zeijl, L. Gonzalez-Calero, et al., Molecular anatomy of ascending aorta in atherosclerosis by MS Imaging:

- Specific lipid and protein patterns reflect pathology, *J. Proteomics*. 126 (2015) 245–251. doi:10.1016/j.jprot.2015.06.005.
- [116] S. Koizumi, S. Yamamoto, T. Hayasaka, Y. Konishi, M. Yamaguchi-Okada, N. Goto-Inoue, et al., Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain, *Neuroscience*. 168 (2010) 219–225. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.056.
- [117] S.R. Shanta, C.S. Choi, J.H. Lee, C.Y. Shin, Y.J. Kim, K.-H. Kim, et al., Global changes in phospholipids identified by MALDI MS in rats with focal cerebral ischemia, *J. Lipid Res*. 53 (2012) 1823–1831. doi:10.1194/jlr.M022558.
- [118] M.A.M. Rodrigo, O. Zitka, S. Krizkova, A. Moullick, V. Adam, R. Kizek, MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 95 (2014) 245–255. doi:10.1016/j.jpba.2014.03.007.
- [119] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 1 (2002) 376–386.
- [120] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat. Biotechnol*. 17 (1999) 994–999. doi:10.1038/13690.
- [121] P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, et al., Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents, *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 3 (2004) 1154–1169. doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200.
- [122] A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, et al., Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem*. 75 (2003) 1895–1904.
- [123] D.S. Spellman, K. Deinhardt, C.C. Darie, M.V. Chao, T.A. Neubert, Stable isotopic labeling by amino acids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling, *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 7 (2008) 1067–1076. doi:10.1074/mcp.M700387-MCP200.
- [124] M.D. Sury, J.-X. Chen, M. Selbach, The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo, *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 9 (2010) 2173–2183. doi:10.1074/mcp.M110.000323.
- [125] M. Krüger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C.A. Luber, F. Forner, et al., SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function, *Cell*. 134 (2008) 353–364. doi:10.1016/j.cell.2008.05.033.

Bibliografia

- [126] P.J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 484–494. doi:10.1038/nprot.2009.21.
- [127] M. Miyagi, K.C.S. Rao, Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 121–136. doi:10.1002/mas.20116.
- [128] M. Sandin, A. Chawade, F. Levander, Is label-free LC-MS/MS ready for biomarker discovery?, *Proteomics Clin. Appl.* 9 (2015) 289–294. doi:10.1002/prca.201400202.
- [129] D. Chelius, P.V. Bondarenko, Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 1 (2002) 317–323.
- [130] H. Liu, R.G. Sadygov, J.R. Yates, A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4193–4201. doi:10.1021/ac0498563.
- [131] K.A. Neilson, N.A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, et al., Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry, *Proteomics.* 11 (2011) 535–553. doi:10.1002/pmic.201000553.
- [132] S.R. Piersma, U. Fiedler, S. Span, A. Lingnau, T.V. Pham, S. Hoffmann, et al., Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 1913–1922. doi:10.1021/pr901072h.
- [133] X. Xie, S. Feng, H. Vuong, Y. Liu, S. Goodison, D.M. Lubman, A comparative phosphoproteomic analysis of a human tumor metastasis model using a label-free quantitative approach, *Electrophoresis.* 31 (2010) 1842–1852. doi:10.1002/elps.200900752.
- [134] C. Li, Q. Qiu, Y. Wang, P. Li, C. Xiao, H. Wang, et al., Time course label-free quantitative analysis of cardiac muscles of rats after myocardial infarction, *Mol. Biosyst.* 10 (2014) 505–513. doi:10.1039/c3mb70422j.
- [135] J.D. Hoheisel, M.S.S. Alhamdani, C. Schröder, Affinity-based microarrays for proteomic analysis of cancer tissues, *Proteomics Clin. Appl.* 7 (2013) 8–15. doi:10.1002/prca.201200114.
- [136] O. Stoevesandt, M.J. Taussig, Affinity proteomics: the role of specific binding reagents in human proteome analysis, *Expert Rev. Proteomics.* 9 (2012) 401–414. doi:10.1586/epr.12.34.
- [137] T.-H. Ku, T. Zhang, H. Luo, T.M. Yen, P.-W. Chen, Y. Han, et al., Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing, *Sensors.* 15 (2015) 16281–16313. doi:10.3390/s150716281.

- [138] M. Hu, K. Zhang, The application of aptamers in cancer research: an up-to-date review, *Future Oncol. Lond. Engl.* 9 (2013) 369–376. doi:10.2217/fon.12.201.
- [139] M. Vogel, E. Keller-Gautschi, M.J. Baumann, P. Amstutz, C. Ruf, F. Kricek, et al., Designed ankyrin repeat proteins as anti-idiotypic-binding molecules, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1109 (2007) 9–18. doi:10.1196/annals.1398.002.
- [140] N. Gahoi, S. Ray, S. Srivastava, Array-based proteomic approaches to study signal transduction pathways: prospects, merits and challenges, *Proteomics.* 15 (2015) 218–231. doi:10.1002/pmic.201400261.
- [141] N.L. Anderson, N.G. Anderson, L.R. Haines, D.B. Hardie, R.W. Olafson, T.W. Pearson, Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA), *J. Proteome Res.* 3 (2004) 235–244.
- [142] J. Montaner, M. Perea-Gainza, P. Delgado, M. Ribó, P. Chacón, A. Rosell, et al., Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers, *Stroke J. Cereb. Circ.* 39 (2008) 2280–2287. doi:10.1161/STROKEAHA.107.505354.
- [143] E.R. DeLong, D.M. DeLong, D.L. Clarke-Pearson, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics.* 44 (1988) 837–845.
- [144] J.W. Pickering, Z.H. Endre, New metrics for assessing diagnostic potential of candidate biomarkers, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN.* 7 (2012) 1355–1364. doi:10.2215/CJN.09590911.
- [145] E. Ben Assayag, S. Shenhar-Tsarfaty, K. Ofek, L. Soreq, I. Bova, L. Shopin, et al., Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality, *Mol. Med. Camb. Mass.* 16 (2010) 278–286. doi:10.2119/molmed.2010.00015.
- [146] H. Kara, M. Akinci, S. Degirmenci, A. Bayir, A. Ak, A. Nayman, et al., High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-related phospholipase A2, and acute ischemic stroke, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10 (2014) 1451–1457. doi:10.2147/NDT.S67665.
- [147] A.M. Mäkikallio, T.H. Mäkikallio, J.T. Korpelainen, O. Vuolteenaho, J.M. Tapanainen, K. Ylitalo, et al., Natriuretic peptides and mortality after stroke, *Stroke J. Cereb. Circ.* 36 (2005) 1016–1020. doi:10.1161/01.STR.0000162751.54349.ae.
- [148] S.-A. An, J. Kim, O.-J. Kim, J.-K. Kim, N.-K. Kim, J. Song, et al., Limited clinical value of multiple blood markers in the diagnosis of ischemic stroke, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 710–715. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.02.005.
- [149] S. González-García, A. González-Quevedo, M. Peña-Sánchez, C. Menéndez-Saínez, R. Fernández-Carrera, M. Arteché-Prior, et al., Serum neuron-specific enolase and S100

Bibliografia

- calcium binding protein B biomarker levels do not improve diagnosis of acute stroke, *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 42 (2012) 199–204. doi:10.4997/JRCPE.2012.302.
- [150] A.C. Fonseca, J.S. Matias, T. Pinho e Melo, F. Falcão, P. Canhão, J.M. Ferro, N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a biomarker of cardioembolic stroke, *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 6 (2011) 398–403. doi:10.1111/j.1747-4949.2011.00606.x.
- [151] A. Suehiro, H. Tsujioka, H. Yoshimoto, S. Higasa, E. Kakishita, Serum macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) level is elevated in patients with old cerebral infarction related to vascular damage, *Am. J. Hematol.* 60 (1999) 185–190.
- [152] R. Brouns, B. De Vil, P. Cras, D. De Surgeloose, P. Mariën, P.P. De Deyn, Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients, *Clin. Chem.* 56 (2010) 451–458. doi:10.1373/clinchem.2009.134122.
- [153] J.-L. Zhang, C.-H. Yin, Y. Zhang, L.-B. Zhao, H.-J. Fu, J.-C. Feng, Plasma copeptin and long-term outcomes in acute ischemic stroke, *Acta Neurol. Scand.* 128 (2013) 372–380. doi:10.1111/ane.12132.
- [154] C. Foerch, M. Niessner, T. Back, M. Bauerle, G.M. De Marchis, A. Ferbert, et al., Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke, *Clin. Chem.* 58 (2012) 237–245. doi:10.1373/clinchem.2011.172676.
- [155] F. Dvorak, I. Haberer, M. Sitzer, C. Foerch, Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke, *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 27 (2009) 37–41. doi:10.1159/000172632.
- [156] S.F. Shariat, Y. Lotan, A. Vickers, P.I. Karakiewicz, B.J. Schmitz-Dräger, P.J. Goebell, et al., Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer, *Urol. Oncol.* 28 (2010) 389–400. doi:10.1016/j.urolonc.2010.02.011.
- [157] G. Arentz, F. Weiland, M.K. Oehler, P. Hoffmann, State of the art of 2D DIGE, *Proteomics Clin. Appl.* 9 (2015) 277–288. doi:10.1002/prca.201400119.
- [158] B.M. Oliveira, J.R. Coorsen, D. Martins-de-Souza, 2DE: the phoenix of proteomics, *J. Proteomics.* 104 (2014) 140–150. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.035.
- [159] M. Mann, Functional and quantitative proteomics using SILAC, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 952–958. doi:10.1038/nrm2067.
- [160] R. Meng, X. Wang, M. Hussain, D. Dornbos, L. Meng, Y. Liu, et al., Evaluation of plasma D-dimer plus fibrinogen in predicting acute CVST, *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 9 (2014) 166–173. doi:10.1111/ijss.12034.

- [161] M.H. Kim, S.Y. Kang, M.C. Kim, W.I. Lee, Plasma biomarkers in the diagnosis of acute ischemic stroke, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 40 (2010) 336–341.
- [162] A. Pandey, A.K. Shrivastava, K. Saxena, Neuron specific enolase and c-reactive protein levels in stroke and its subtypes: correlation with degree of disability, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 1426–1432. doi:10.1007/s11064-014-1328-9.
- [163] U. Waje-Andreassen, J. Kråkenes, E. Ulvestad, L. Thomassen, K.-M. Myhr, J. Aarseth, et al., IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke, *Acta Neurol. Scand.* 111 (2005) 360–365. doi:10.1111/j.1600-0404.2005.00416.x.
- [164] P.J. Modrego, B. Boned, J.J. Berlanga, M. Serrano, Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema, *Int. J. Med. Sci.* 5 (2008) 18–23.
- [165] S.A. Roudbary, F. Saadat, K. Forghanparast, R. Sohrabnejad, Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke, *Acta Med. Iran.* 49 (2011) 149–152.
- [166] M. Ustundag, M. Orak, C. Guloglu, E. Ozturk, Y. Tamam, E. Kale, The Role of Serum Ferritin, Pro-brain Natriuretic Peptide and Homocysteine Levels in Determining Ischaemic Stroke Subtype, Severity and Mortality, *Hong Kong J. Emerg. Med.* 17 (2010) 13.
- [167] J. Undén, K. Strandberg, J. Malm, E. Campbell, L. Rosengren, J. Stenflo, et al., Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation, *J. Neurol.* 256 (2009) 72–77. doi:10.1007/s00415-009-0054-8.
- [168] M.A. Koenig, H.A. Puttgen, V. Prabhakaran, D. Reich, R.D. Stevens, B-type natriuretic peptide as a marker for heart failure in patients with acute stroke, *Intensive Care Med.* 33 (2007) 1587–1593. doi:10.1007/s00134-007-0704-1.
- [169] N. Anand, L.G. Stead, Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review, *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 20 (2005) 213–219. doi:10.1159/000087701.
- [170] G.C. Jickling, D. Liu, B. Stamova, B.P. Ander, X. Zhan, A. Lu, et al., Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (2014) 185–199. doi:10.1038/jcbfm.2013.203.
- [171] K.J. Brown, H. Seol, D.K. Pillai, B.-J. Sankoorikal, C.A. Formolo, J. Mac, et al., The human secretome atlas initiative: implications in health and disease conditions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1834 (2013) 2454–2461. doi:10.1016/j.bbapap.2013.04.007.

Bibliografía

- [172] P. Dowling, M. Clynes, Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers, *Proteomics*. 11 (2011) 794–804. doi:10.1002/pmic.201000530.
- [173] M. Stastna, J.E. Van Eyk, Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery, *Proteomics*. 12 (2012) 722–735. doi:10.1002/pmic.201100346.
- [174] T.H. Sanderson, C.A. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, M. Hüttemann, Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation, *Mol. Neurobiol.* 47 (2013) 9–23. doi:10.1007/s12035-012-8344-z.
- [175] H. Onodera, K. Iijima, K. Kogure, Mononucleotide metabolism in the rat brain after transient ischemia, *J. Neurochem.* 46 (1986) 1704–1710.
- [176] M. Cansev, Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization, *Brain Res. Rev.* 52 (2006) 389–397. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.05.001.
- [177] J.M. Boggs, Myelin basic protein: a multifunctional protein, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 63 (2006) 1945–1961. doi:10.1007/s00018-006-6094-7.
- [178] Y. Chen, Q. Yi, G. Liu, X. Shen, L. Xuan, Y. Tian, Cerebral white matter injury and damage to myelin sheath following whole-brain ischemia, *Brain Res.* 1495 (2013) 11–17. doi:10.1016/j.brainres.2012.12.006.
- [179] E.J. Walker, G.A. Rosenberg, Divergent role for MMP-2 in myelin breakdown and oligodendrocyte death following transient global ischemia, *J. Neurosci. Res.* 88 (2010) 764–773. doi:10.1002/jnr.22257.
- [180] B. Balluff, S. Rauser, S. Meding, M. Elsner, C. Schöne, A. Feuchtinger, et al., MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 2720–2729. doi:10.1016/j.ajpath.2011.08.032.
- [181] S. Rauser, C. Marquardt, B. Balluff, S.-O. Deininger, C. Albers, E. Belau, et al., Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 1854–1863. doi:10.1021/pr901008d.
- [182] J.A. Bauer, A.B. Chakravarthy, J.M. Rosenbluth, D. Mi, E.H. Seeley, N. De Matos Granja-Ingram, et al., Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16 (2010) 681–690. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1091.
- [183] O. Klein, K. Strohschein, G. Nebrich, J. Oetjen, D. Trede, H. Thiele, et al., MALDI imaging mass spectrometry: discrimination of pathophysiological regions in traumatized skeletal

- muscle by characteristic peptide signatures, *Proteomics*. 14 (2014) 2249–2260. doi:10.1002/pmic.201400088.
- [184] D.G. Nowak, E.M. Amin, E.S. Rennel, C. Hoareau-Aveilla, M. Gammons, G. Damodoran, et al., Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 5532–5540. doi:10.1074/jbc.M109.074930.
- [185] J.G. Carter, J. Cherry, K. Williams, S. Turner, D.O. Bates, A.J. Churchill, Splicing factor polymorphisms, the control of VEGF isoforms and association with angiogenic eye disease, *Curr. Eye Res.* 36 (2011) 328–335. doi:10.3109/02713683.2010.548892.
- [186] J. Finley, Alteration of splice site selection in the LMNA gene and inhibition of progerin production via AMPK activation, *Med. Hypotheses*. 83 (2014) 580–587. doi:10.1016/j.mehy.2014.08.016.
- [187] K. Mikoshiba, Inositol 1,4,5-trisphosphate IP(3) receptors and their role in neuronal cell function, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1627–1633. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03985.x.
- [188] L.J. Martin, A.M. Brambrink, C. Lehmann, C. Portera-Cailliau, R. Koehler, J. Rothstein, et al., Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 335–348. doi:10.1002/ana.410420310.
- [189] S. Fukamachi, A. Furuta, T. Ikeda, T. Ikenoue, T. Kaneoka, J.D. Rothstein, et al., Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 132 (2001) 131–139.
- [190] V.L. Rao, K.K. Bowen, R.J. Dempsey, Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 497–502.
- [191] M. Ebinger, B. Winter, M. Wendt, J.E. Weber, C. Waldschmidt, M. Rozanski, et al., Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial, *JAMA*. 311 (2014) 1622–1631. doi:10.1001/jama.2014.2850.
- [192] D.M. Stanca, I.C. Mărginean, O. Sorițău, D.F. Mureșanu, Plasmatic markers for early diagnostic and treatment decisions in ischemic stroke, *J. Med. Life*. 8 Spec Issue (2015) 21–25.
- [193] J.L. Saver, Time is brain—quantified, *Stroke J. Cereb. Circ.* 37 (2006) 263–266. doi:10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab.

Bibliografia

- [194] M. Wendt, M. Ebinger, A. Kunz, M. Rozanski, C. Waldschmidt, J.E. Weber, et al., Copeptin Levels in Patients With Acute Ischemic Stroke and Stroke Mimics, *Stroke J. Cereb. Circ.* 46 (2015) 2426–2431. doi:10.1161/STROKEAHA.115.009877.

8. ABREVIACIONES

Abreviaciones

ADAMST13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif 13
Ainx	alpha-interneuron
AIT	ataque isquémico transitorio
ALB	albumina
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANP32B	acidic nuclear phosphoprotein 32 family member B
ANXA1	annexin 2
APO	apolipoproteína
APOC-III	apolipoproteína CIII
Arg	arginina
ATP	adenosín trifosfato
ATP5a	ATP synthase subunit alpha
ATP5b	ATP synthase subunit beta
AUC	area under the curve
BBB	blood-brain barrier
BGN	biglycan
BNP	brain natriuretic peptide
Bsyn	Beta-synuclein
Ca ²⁺	ión calcio
CAA	cerebral amyloid angiopathy
CADASIL	Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CALB2	calbindin 2
CARNS1	carnosine sintasa 1
CATD	Catechol-2,3-Dioxygenase Membrane Subunit
CAT-D	cathepsin D
CAYP	calcyphosine
CE	capillary electroforesis
CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CLU	clusterin
CO ₂	dióxido de carbono
COFRADIC	COmbined FRActional Dlagonal Chromatography
COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CSF	líquido cefaloraquídeo
DARPs	designed ankyrin repeat proteins
DEFA1	Neutrophil defensin 1
dFBS	suero bovino fetal dializado
DIGE	Difference gel electrophoresis
DPYSL3	Dihydropyrimidinase-Like 3
DRP2	Dystrophin related protein 2
EAA2	Excitatory Amino Acid Transporter-2
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EF2	Eukaryotic elongation factor 2
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ENO1	alpha enolase 1

ESI	electrospray ionization
FABA	fatty acids-binding protein adipocyte
FABE	fatty acids-binding protein epidermal
FBLN3	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
FBS	suero bovino fetal
Fe	hierro
FGF-b	basic fibroblast growth factor
GABA	ácido γ -aminobutírico
GANAB	Glucosidase, Alpha; Neutral AB
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GPF	gas phase fractionation
GRP78	Glucose-regulated protein 78
GSTP-1	glutathione S-transferase P
HB	hemoglobina
hCMEC/D3	Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line
h-FABP	Heart-type fatty acid-binding protein
HI	hemorrhagic infarct
HSP70	Heat shock protein 70
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
iCAT	isotope coded affinity tags
iCAT	Isotope Coded Affinity Tag
IDI	Integrated Discrimination Improvement index
IGFBP2	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2
IP3R1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1
IT	ion trap
iTRAQ	isotope tagging for relative and absolute quantification
iTRAQ	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
LATS1	Serin/treonin-protein quinasa LATS1
LC	cromatografía líquida
LDH	Lactato deshidrogenasa
LRP1	Low density receptor related protein 1
Lys	lisina
MALDI matrix	assisted laser desorption ionization
MAP2	microtubule-associated protein
MAPT-tau	microtubule-associated protein tau
MBP	Myelin Basic Protein
MCA	middle cerebral artery
MMP	matrix metalloproteinase
MMP9	matrix metalloproteinase 9
MPO	Mieloperoxidasa
MS	mass spectrometry
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NDKA	nucleoside diphosphate kinase A
NEF3	neurofilamento medio

Abreviaciones

NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NSE	Neuron-specific enolase
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
O ₂	oxígeno
OGD	oxygen and glucose deprivation
OR	odds ratio
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PARK7	parkinson disease protein 7
PDX5	peroxiredoxin 5
PGHD	prostaglandin D synthase
PH	parenchymal hematoma
pMCAO	permanent middle cerebral artery occlusion
PMF	peptide mass fingerprint
PPIA	peptidylpropyl isomerase A
PRDX1	peroxiredoxin 1
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PRX3	peroxiredoxin 3
QTOF	cuadrupolo acoplado a TOF
R3-IGF-1	R3 Insulin Like Growth Factor-1
RAGE	Receptor of Advanced Glycation End products
RBP4	Retinol Binding Protein 4
RM	resonancia magnética
ROC	receiver operating characteristic
ROI	región de interés
ROS	reactive oxygen species
rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator
SA	sinapinic acid
SAX	Strong Anion Exchange
scFv	single chain variable fragments
SCX	Strong cation exchange
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SELDI	Surface enhanced laser desorption ionization
SELDI	Surface-enhanced laser desorption/ionization
SILAC	stable isotope labeling with aminoacids in cell culture
SIRT2	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2
SISCAPA	Stable Isotope Standards with capture by Anti-peptide Antibodies
SPTAN1	spectrin alpha, non-erythrocytic 1
SRM	Selected reaction monitoring
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STEMO	STroke Emergency MObile
SYN1	Synapsin 1
TC	tomografía computarizada
TIMP	TIMP metalloproteinase inhibitor
TIMP2	metalloproteinase inhibitor 2
TIMS	thermal ionization mass spectrometry

tMCAO	transient middle cerebral artery occlusion
Tmod2	Tropomodulin 2
TMT	tandem mass tag
TMT	Tandem Mass Tags
TMT	Tandem mass tags
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
TOF	Time of flight
TOF	Time of Flight
TSP-1	Trombospondin-1
UCHL-1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
UFD-1	ubiquitin fusion degradation protein 1
UPLC	Ultrapformance liquif cromatography
UQCRC2	Complex III subunit Core 2
VCAM-1	Vascular Adhesion Mollecule-1
VDAC1	voltage dependent anion channel 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIM	vimentin
vWF	von Willebrand factor