

## Microdiálisis de alta resolución. Aspectos metodológicos y aplicación al estudio de la respuesta inflamatoria cerebral

J.A. De Los Rios\*; J. Sahuquillo\*,\*\*; M.A. Merino\*; M.A. Poca\*,\*\* y L. Expósito\*\*\*

Unidad de Investigación de Neurotraumatología y Neurocirugía (UNINN)\*. Servicio de Neurocirugía\*\*. Unidad de Cuidados Intensivos de Neurotraumatología\*\*\*. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Institut Fundació de Recerca Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona.

### Resumen

La técnica de microdiálisis (MD) cerebral es un instrumento que proporciona información relevante en la monitorización del metabolismo cerebral en pacientes neurocríticos. La MD es una técnica especialmente efectiva para la detección y análisis de pequeñas moléculas, puesto que el tamaño de los poros de la membrana dializante actúa como barrera restringiendo el paso de especies mayores, tales como proteínas u otras macromoléculas. La reciente disponibilidad de catéteres de microdiálisis con poros de mayor calibre, denominados de “alta resolución”, permite ampliar el rango de moléculas detectables en el dializado. Sin embargo, existen complicaciones técnicas relacionadas con la utilización de estos catéteres para estos propósitos, por lo que esta capacidad potencial para la recuperación de proteínas necesita ser validada antes de su aplicación como herramienta para estudios de proteómica asociados a la lesión cerebral. En esta revisión se contemplan los principios básicos de la microdiálisis y los diferentes factores que intervienen en los procesos de recuperación de moléculas en el dializado, tales como las características físicas de la membrana dializante, así como de las moléculas que se desea investigar.

**PALABRAS CLAVE:** Microdiálisis. Punto de corte de membrana. Recuperación relativa. Citocinas. Quimiocinas. Neuroinflamación. Traumatismo craneoencefálico.

**High Resolution Microdialysis. Methodological issues and application to the study of inflammatory brain response**

### Summary

Cerebral microdialysis is a tool that provides very relevant information in the metabolic monitoring of brain injured patients. It is a particularly effective

technique for the detection and analysis of small molecules, given that the pores of the dialysis membrane act as a barrier to restrict the transport of larger species, such as proteins and other macromolecules. The recent availability of microdialysis catheters with membrane pores of larger size, termed “high resolution” catheters, would widen the spectrum of molecules detectable in the dialysate. However, there are technical complications related to the use of these catheters for such purposes, and therefore, this potential capacity for the recovery of proteins needs to be validated, in order to begin its application as a tool in studies of proteomics associated with brain injuries. The following review depicts the basic principles of microdialysis, and describes some of the issues involved in the recovery of molecules in the dialysate, including the physical properties of the dialysis membrane and of the molecules of interest.

*Abreviaturas.* BHE: barrera hematoencefálica. Cd: concentración del analito en el dializado. Ce: concentración del analito en el exterior del catéter. cm H<sub>2</sub>O: centímetros de agua, unidad de presión. cut-off: punto de corte de peso molecular. D: difusividad, coeficiente de difusión. EE: eficiencia de extracción (extraction efficiency). Estándar: solución de concentración conocida de las proteínas purificadas. FMF: fuerza neta de movimiento de flujo. H: altura; Presión hidrostática. IL: interleucina. J, Jv: flujo neto. kDa: kilo Daltons, unidad de peso molecular. Kf: permeabilidad de la membrana (constante de filtración). LCR: líquido cefalorraquídeo. LPS: lipopolisacárido bacteriano. MD: microdiálisis. mmHg: milímetros de mercurio. mmol: milimoles. MMP: metaloproteasa de matriz. nm: nanometros. PDB: base de datos de proteínas (Protein Data Bank). PES: polietersulfona. PM: peso molecular. Rd: resistencia a la difusión cerniente al dializado. Re: resistencia a la difusión cerniente al exterior de la membrana. Rm: resistencia a la difusión cerniente a la membrana. RR: recuperación relativa. SEM: microscopía electrónica de barrido. TCE: traumatismo craneoencefálico. TNFa: factor de necrosis tumoral-alfa. Tri-foil: estructura terciaria de triple hoja.

Recibido: 14-07-08. Aceptado: 9-02-09

**KEY WORDS:** Microdialysis. Membrane cut off. Relative recovery. Cytokines. Chemokines. Neuroinflammation. Traumatic brain injury.

## Introducción

El impacto mecánico en un traumatismo craneoencefálico grave (TCEG) desencadena una serie de cambios neuroquímicos, que en parte corresponden a procesos celulares y moleculares vinculados a una respuesta inflamatoria. Esta respuesta tiene, por un lado, el propósito de proteger y reparar el tejido dañado, pero por otro, acarrea consecuencias nocivas debido a la liberación de sustancias neurotóxicas. La cascada neuroinflamatoria que surge a raíz de estos acontecimientos puede exacerbar el daño neurológico y se incluye dentro de una categoría de procesos que, en conjunto, se conocen como lesión secundaria<sup>19</sup>.

La respuesta inmune, y por lo tanto, la respuesta inflamatoria cerebral, implica a células linfoides, células inflamatorias y al sistema hematopoiético. Las interacciones entre todas estas células está modulada por un grupo de proteínas mensajeras denominadas citocinas (CKs), cuya principal actividad es la de conectar a las distintas células implicadas en la repuesta inmune. Entre sus múltiples funciones, estas proteínas de bajo peso molecular aumentan la permeabilidad vascular, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), inducen la formación de edema, la expresión de moléculas de adhesión e infiltración celular y la amplificación de la expresión de otros mediadores proinflamatorios. Además de estas funciones, las CKs ejercen efectos directos sobre las neuronas y las células gliales activando procesos potencialmente deletéreos. Como parte del proceso neuroinflamatorio, se sobreexpresan también un grupo de proteasas neutras, las denominadas metaloproteasas de matriz (MMP), y particularmente la MMP-2 y MMP-9, también conocidas como gelatinasas<sup>100</sup>. Las gelatinasas juegan un papel importante en la alteración de la permeabilidad de la BHE mediante la degradación de la membrana basal<sup>70,76</sup>.

El conocimiento más detallado de las interacciones entre las distintas moléculas implicadas en la cascada neuroinflamatoria podría ayudar a una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos implicados en la lesión secundaria. Esto permitiría identificar nuevas opciones terapéuticas destinadas a limitar el empeoramiento de las lesiones y a mejorar la mortalidad y el pronóstico funcional de los pacientes que sobreviven a un TCEG.

Uno de los métodos más potentes para obtener información acerca de la presencia y concentración de estas moléculas en el tejido cerebral es la microdialísis (MD). Esta técnica se ha convertido en los últimos años en una herramienta excelente para el desarrollo de proyectos de investigación traslacional en neurociencias. La MD se uti-

liza en la actualidad como técnica para la monitorización de la bioquímica tisular de cualquier tejido, incluido el cerebral, y tiene un amplio espectro de aplicación en diversas especialidades clínicas. Esta técnica es especialmente relevante en el contexto del paciente neurocrítico, donde la MD permite documentar los cambios metabólicos regionales que ocurren en el cerebro lesionado<sup>16,18,34,43,44,94,97</sup>.

Hasta muy recientemente, la microdialísis sólo permitía el análisis de metabolitos y de sustancias hidrosolubles de bajo peso molecular (PM). El tamaño de poro de la membrana actúa como factor limitante a la hora de seleccionar el espectro molecular final del dializado. Los catéteres de MD disponibles comercialmente hasta hace poco se construían con membranas con un punto de corte (*cut-off*) de 20 kDa (CMA 70 Microdialysis, Solna, Suecia). El denominado "cut-off" se define como el peso molecular (PM) expresado en Daltons a partir del cual el 80% de las moléculas no atraviesan la membrana dializante. Por este motivo, los grupos de investigación interesados en moléculas más complejas, tanto en estructura como en PM, debían diseñar sus propias membranas adaptándolas a sus necesidades<sup>107</sup>. La reciente disponibilidad comercial de catéteres de MD con membranas de mayor tamaño de poro (100 kDa) ha ampliado el repertorio de sustancias analizables en el microdializado, permitiendo la posibilidad de determinar niveles *in vivo* de moléculas de gran interés en el estudio de diversas patologías, incluidas, entre otras, diversas proteínas, como las CKs. Maurer et al.<sup>61</sup>, utilizando membranas de 20 kDa, detectaron hasta diez proteínas en el microdializado cerebral de pacientes con un ictus isquémico que no fueron detectadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

La MD aplicada al estudio de las proteínas existentes en el espacio intersticial cerebral (EIC) puede aportar un conocimiento mucho más profundo de las complejas interacciones moleculares que tienen lugar en el parénquima cerebral lesionado. Sin embargo, las propiedades de estas proteínas, tales como su tamaño, su forma, y la distribución heterogénea de sus cargas eléctricas, provocan diferencias importantes en la recuperación de estas moléculas en el microdializado cuando se compara con analitos de menor complejidad molecular.

Entre las proteínas que generan un mayor interés en el estudio de procesos inflamatorios en la lesión cerebral aguda se encuentran una serie de moléculas con especial relevancia en la respuesta inflamatoria cerebral, las denominadas citocinas, y entre ellas las quimiocinas e interleucinas (ILs). La IL1 $\beta$ , la IL6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) son moléculas implicadas en la activación de la respuesta inflamatoria precoz innata. La IL10 tiene en cambio una actividad anti-inflamatoria y la IL8 pertenece a la familia de las quimiocinas, implicadas en la migración de leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la zona lesionada. Por otro lado, las gelatinasas están involucradas

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3071507>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3071507>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)