

Estudio prospectivo basado en proteómica para identificar biomarcadores diagnósticos de daño en isquemia cerebral inducida en un modelo de rata

Hugo Sánchez-Hernández¹, Carlos Omar Vite-Bazan¹, Yessica Heras-Romero², Febe Elena Cázares Raga¹, Leticia Cortés Martínez¹, Alma Ortiz Plata³, Fidel de la Cruz Hernández-Hernández¹

RESUMEN

La enfermedad cerebrovascular es la tercera causa de muerte en México como en el mundo, dentro de estos trastornos está la isquemia cerebral focal (ICF), definida como la disminución de oxígeno y glucosa por obstrucción del flujo sanguíneo en una zona cerebral localizada. La iniciación de la isquemia conlleva cambios no descritos en las moléculas de las células de la región afectada y sus alrededores, los cuales podrían ser detectados e identificados como biomarcadores en fluidos corporales de fácil obtención y análisis, como el suero sanguíneo, los cuales serían útiles en la práctica clínica. **Objetivo:** analizar cambios en el perfil de proteínas del suero sanguíneo (SS) de ratas con 1h de ICF con y sin 24 hs de reperfusión sanguínea (RPF) comparando con muestras de animales intactos y operados pero sin ICF, para identificar posibles biomarcadores tempranos de la enfermedad. **Material y métodos:** se indujo ICF/RPF en ratas Wistar, se obtuvo el SS, se procesó para eliminar albúmina e inmunoglobulinas. Para observar la expresión diferencial de proteínas, las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensional y las imágenes de los geles se analizaron con la ayuda del software *ImageMaster 2D Platinum*. **Resultados:** se encontraron ocho proteínas entre 37 y 14 kDa, de las cuales cinco aumentaron y tres disminuyeron su concentración con respecto a los controles. Las ocho proteínas serán identificadas por espectrometría de masas (MS), se analizará su papel como posibles biomarcadores tempranos de la enfermedad. **Discusión y conclusiones:** el análisis de proteínas en biofluidos se utiliza en la búsqueda de marcadores para el diagnóstico y control de enfermedades. Se sabe que con la ICF, las proteínas de

regiones específicas del cerebro cambian su expresión y localización, agravando o disminuyendo el daño dentro del proceso isquémico; sin embargo, no es conocido si alguna de estas moléculas cambia o aparece; asimismo, cambia su cantidad en el suero, lo cual, si ocurre, podría proporcionar marcadores diagnósticos útiles para identificar el grado de avance de la enfermedad.

Palabras clave: isquemia cerebral, suero sanguíneo, proteínas diferenciales, biomarcadores.

A PROSPECTIVE PROTEOMIC-BASED STUDY FOR IDENTIFYING POTENTIAL BIOMARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF DAMAGE IN FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA INDUCED IN A RAT MODEL

ABSTRACT

Cerebral vascular diseases are the third cause of death in Mexico and around the world; including focal cerebral ischemia (FCI) that leads to reduced blood supply in a specific zone of the brain, diminishing the glucose and oxygen. In early FCI stages there are molecular changes

¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. ²Departamento de Bioterio. Laboratorio de Neuropatología Experimental. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. ³Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Hugo Sánchez-Hernández. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. 07360. E-mail: hsanchez@cinvestav.mx

not well described in the cells of the affected and surrounding regions; these changes could be detected and used as biomarkers in easily accessed corporal fluids as blood serum (BS), in order to define biomarkers useful for disease advance diagnostic. *Objective:* analyze protein profile of rat sanguineous serum after 1h of FCI with or without 24h of sanguineous reperfusion (rpf), in order to identify possible early FCI biomarkers. *Material and methods:* cerebral focal ischemia was experimentally induced in brain rat, BS was obtained and serum albumin and immunoglobulin were depleted. Protein profile of serum samples were obtained by two dimensional gel electrophoresis, the images were analyzed using ImageMaster 2D Platinum software allowing to identify proteins present differentially in FCI. *Results:* under FCI and rpf, we observed up regulation of five proteins and down regulation of three proteins. To analyze their role as biomarkers in FCI, those proteins will be identified by mass spectrometry. *Discussion and conclusion:* protein analysis of corporal liquids is useful to find biomarkers to diagnostic and disease control. Proteins changes expression and localization with FCI aggrieving or dismissing injury, and BS could contain diagnostic markers to FCI useful to identify early changes in neurons and glial cells.

Key words: cerebral ischemia, sanguineous serum, differential proteins, biomarkers.

La enfermedad cerebrovascular (ECV) se refiere a cualquier trastorno donde estén involucrados los vasos sanguíneos cerebrales, originada por la disminución brusca del aporte sanguíneo en un proceso patológico, afectando una determinada área del encéfalo¹. Esta es la tercera causa de muerte en México como en el mundo, la primera de discapacidad². La mayoría de los accidentes cerebrovasculares son de tipo isquémico que se originan por la oclusión aguda por un trombo o émbolo de una de las principales arterias cerebrales, lo que provoca disminución de perfusión de la región cerebral irrigada por dicha arteria. La isquemia cerebral focal (ICF), definida como la disminución de oxígeno y glucosa por obstrucción del flujo sanguíneo en una zona cerebral localizada, es la segunda causa de muerte en el mundo y la primera de discapacidad^{3,4}.

La ICF induce cambios metabólicos, bioquímicos y de la expresión genética en las neuronas y células de la glía de la zona dañada. Durante este proceso, las proteínas cambian su expresión y/o localización, agravando o disminuyendo el daño durante el proceso isquémico. El método usual para reducir o prevenir daño neurológico a los pacientes que sufren de isquemia cerebral es la restauración del flujo sanguíneo

(reperfusión) al tejido isquémico. Sin embargo, la reperfusión causa daño adicional y exacerba el deterioro de esa zona cerebral, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la mitocondria dañando los componentes celulares e iniciando muerte celular⁵.

El tratamiento de la isquemia presenta varias limitantes debido a que la ventana terapéutica es muy reducida, por lo que el diagnóstico oportuno y acertado del infarto isquémico es fundamental para evitar daños irreversibles en el paciente⁶.

Hoy, la proteómica tiene un papel importante en el descubrimiento-evaluación-validación de proteínas como biomarcadores asociados a enfermedades. Estos biomarcadores reflejan los cambios, ya sean bioquímicos, morfológicos o fisiológicos, que ocurren específicamente en una enfermedad determinada, para ser útil, su comportamiento tiene que ser reproducible y con facilidad detectable. El análisis de las proteínas específicas en los fluidos biológicos se ha utilizado desde hace mucho tiempo para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades⁷. Los biofluidos están en contacto directo con los tejidos y los cambios que acompañan a una enfermedad podrían reflejarse en su composición y/o concentración de sus componentes protéicos, ya que se secretan o liberan a éstos. Debido a su fácil accesibilidad en comparación con las biopsias tisulares, los biofluidos como el suero son la muestra más adecuada para la búsqueda de marcadores biológicos de diagnóstico, pronóstico y valoración del tratamiento de las enfermedades⁶. Debido a que el suero contiene 22 proteínas mayoritarias que representan aproximadamente el 99% del contenido protéico, entre las cuales están albúmina, inmunoglobulinas, haptoglobinas y transferrina, es necesario separarlas o eliminarlas para observar las proteínas minoritarias. Recién se ha sugerido que esta fracción de proteínas de baja abundancia, con frecuencia de bajo peso molecular, tiene el potencial más alto para el descubrimiento de nuevos biomarcadores⁸.

En la actualidad el único tratamiento aprobado por la FDA (*Food Drug Administration*) para el control del infarto isquémico es el tratamiento con activadores de plasminógeno tisular, un agente trombolítico que limita por si sólo el daño isquémico al lisar los trombos arteriales y restaurar el flujo sanguíneo. Sin embargo, el tratamiento debe limitarse a las primeras 3 hs después de la oclusión, ya que posterior a este tiempo, el daño comienza a ser irreversible. En nuestro grupo estamos realizando el análisis proteómico tanto del tejido cerebral dañado y de penumbra como del suero de ratas con isquemia cerebral focal inducida en tiempos tempranos (1 h/reperfusión de 24 hs). Describimos el análisis de las proteínas del suero de ratas con isquemia

e isquemia reperfusión tempranas, donde se muestra el aumento o disminución de la concentración de varias proteínas de mediano y bajo peso molecular, que en breve serán analizadas por espectrometría de masas. La identificación de estas proteínas nos ayudará a identificar y proponer su mecanismo de liberación del tejido dañado hacia el suero y su posible función durante el proceso isquémico, con las cuales podamos proponer una posible intervención terapéutica oportuna, para evitar la muerte celular en un área más extensa al foco isquémico⁹ (neuroprotección).

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de isquemia cerebral focal

A ratas Wistar macho de 4 meses de edad (280 g a 300 g de peso), se les indujo isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) con la técnica descrita por Zea Longa¹⁰. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano al 2% (Laboratorios PISA, S.A. de C.V., Guadalajara Jalisco, México) y oxígeno (v/v) con un equipo de anestesia Ohmeda Fluotec-3 (West Yorkshire, Inglaterra). La ACM fue ocluída por la introducción intraluminal de un hilo nylon de calibre 3-0, a través de la arteria carótida interna izquierda. Transcurrió 1h de isquemia cerebral focal sin reperfusión sanguínea¹¹⁻¹⁸. En otro grupo, después de 1h de ICF se permitió la reperfusión sanguínea durante 24 hs. Un grupo de ratas, control del procedimiento quirúrgico (*sham*) sólo fue sometido a éste sin inducir isquemia. El grupo control normal fueron ratas intactas. Para todos los grupos se utilizó una n = 3. El manejo de los animales fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Eliminación de albúmina e inmunoglobulinas de los especímenes

Después de inducir y evaluar el daño neurológico en el animal, se tomó la muestra sanguínea por punción intracardiaca, el suero sanguíneo fue separado por centrifugación. Para eliminar la albúmina e inmunoglobulinas se utilizó el sistema Vivapure anti-HSA (Sartorius Stedim Bioteck, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, a 40 µl de suero se agregaron 400 µl de resina, la mezcla se coloincubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 400 x g por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante (~40 µl) al que se le agregaron 200 µl de buffer de muestra para isoelectroenfoque (IEF) [urea 7 M (Bio-Rad, EUA),

tiourea 2 M (GE Healthcare, Suecia), CHAPS 4% (Roche, EUA), amortiguador IPG 2% (GE Healthcare, Suecia), DTT 40 mM (Invitrogen, EUA) en agua Milli-Q], se agregaron 30 µl de un cóctel de inhibidores de proteasas (complete mini, Roche EUA) y 30 µl de un cóctel de inhibidores de fosfatases (PhosStop, Roche Alemania). La muestra se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 1 minuto a 400 x g y se recuperó el sobrenadante.

Extracción de las proteínas

Para eliminar impurezas, las muestras de suero obtenidas en el paso anterior se precipitaron sucesivamente con acetona y metanol/cloroformo. Por último, las pastillas se disolvieron en solución de hidratación para isoelectroenfoque con inhibidores de proteasas y de fosfatases¹⁸.

Las proteínas se cuantificaron usando el 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences, EUA), se ajustó el volumen con solución de hidratación para obtener 150 µg de proteínas en 124 µl de la solución homogenizada y se agregaron 2 µl de azul de bromofenol al 0.002% (Bio-Rad, EUA).

Electroforesis bidimensional

El análisis de proteínas por electroforésis bidimensional (2D) se realizó utilizando el sistema de tiras preelaboradas (Görg et al, 2000), para isoelectroenfoque (IEF) (gradiente de pH 4-7, 7 cm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia), se dejaron hidratar durante 16 hs con la muestra, y se realizó la primera dimensión en el sistema Ettan IPGphor 3 para isoelectroenfoque (GE Healthcare, Suecia). El programa para la corrida de isoelectroenfoque de pH de 4-7 constó de cuatro pasos: 1. Voltaje de 300V y 200Vh, 2. 1000V y 300Vh, 3. 5000V y 4500Vh y el 4. 5000V y 2000Vh y duró ~3 hs. Para la segunda dimensión, se prepararon geles PAGE-SDS al 15% se tiñeron con el colorante de azul de Coomassie coloidal (G250 Bio-Safe, Bio-Rad, EUA). Las imágenes de los geles se obtuvieron en el ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) y el patrón de expresión de proteínas se analizó con estas imágenes usando el software ImageMaster Platinum 2D 7.0 (Amersham Biosciences, EUA).

Para cuantificar la cantidad de cada mancha de proteína en las imágenes, para cada condición se seleccionó la imagen de un gel como control interno (la cantidad relativa de proteína es expresado como el porcentaje del volumen del punto representando una cierta proteína, en comparación con el volumen de todos los puntos considerados en el gel) para utilizarse

como referencia en la comparación y así identificar los puntos que variaron entre las condiciones. Despues, se obtuvo la imagen en 3D de cada punto en las 4 condiciones experimentales del suero sanguíneo (figuras 1 y 2) y se calculó el volumen para comprobar el cambio de expresión cuantitativamente (tabla 1).

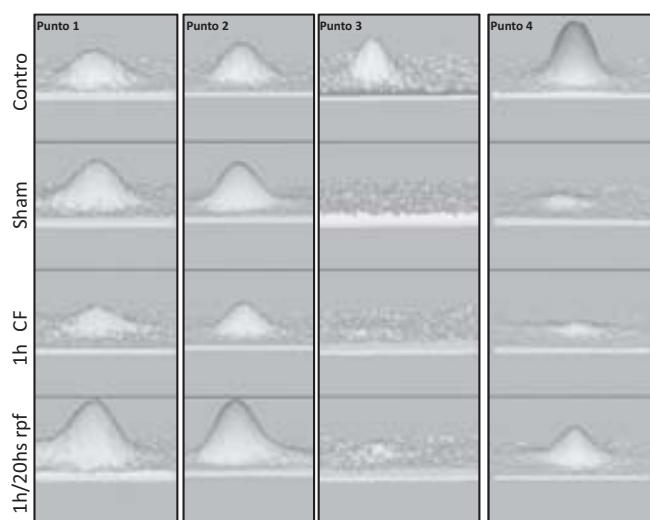


Figura 1. Gráficos 3D de los puntos 1 al 4 del suero sanguíneo con cambios en el volumen con respecto a los controles. Resultados obtenidos con el software *image master 2D platinum 7.0*. En estas imágenes se observa el cambio de expresión de los puntos analizados.

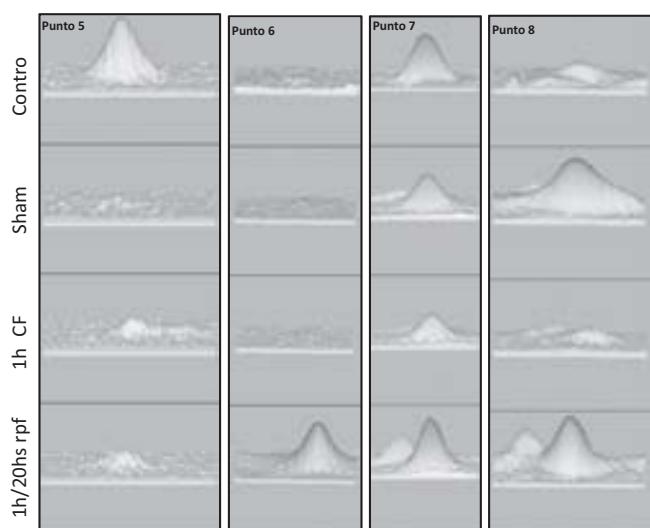


Figura 2. Gráficos 3D de los puntos 5 al 8 del suero sanguíneo con cambios en el volumen con respecto a los controles. Resultados obtenidos con el software *image master 2D platinum 7.0*. En estas imágenes se observa el cambio de expresión de los puntos analizados.

RESULTADOS

Las proteínas del suero del control, *sham* y las distintas condiciones experimentales se separaron

mediante electroforésis bidimensional. En promedio, en cada gel, se resolvieron 145 puntos representados por las proteínas mayoritarias mostrando una distribución general semejante. La mayoría de los puntos resueltos se encuentran en un rango de pH entre 4.5 y 6.5 y entre 25 y 150 kDa. También se resolvió un grupo de 11 puntos entre 10 y 20 kDa (figura 3).

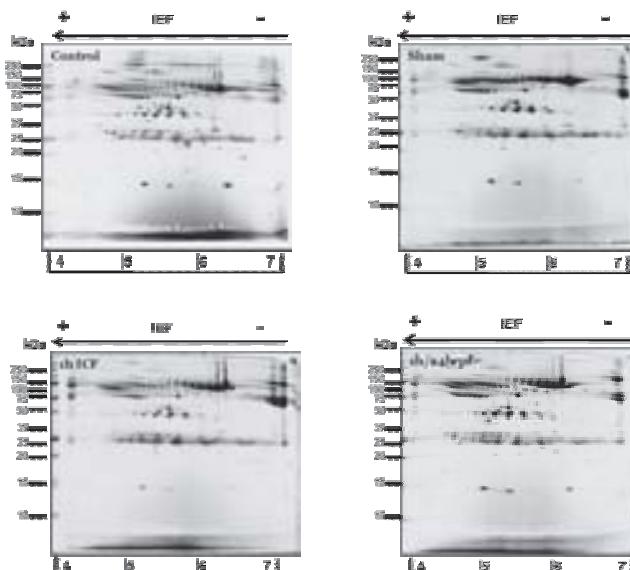


Figura 3. Análisis por electroforesis bidimensional de las proteínas mayoritarias del suero sanguíneo de ratas con ICF/RPF sanguínea. Las proteínas se separaron por IEF en tiras de pH 4-7 y en PAGE SDS al 15%. Los geles se tiñeron con azul de coomassie coloidal.

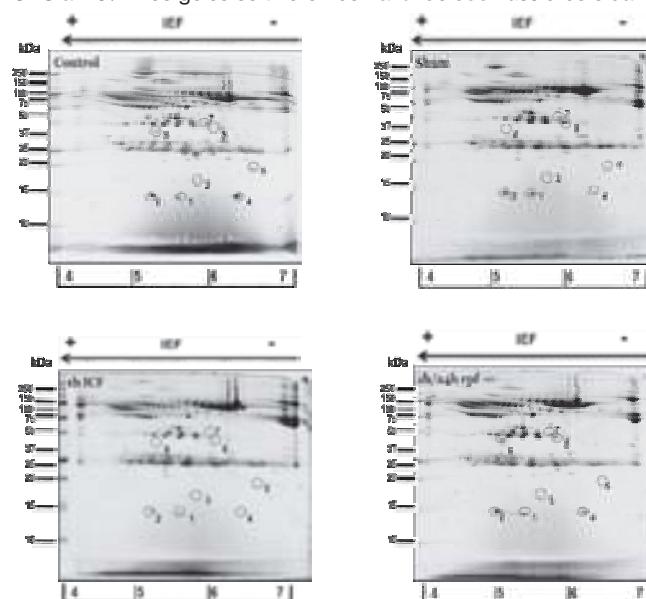


Figura 4. Análisis de la expresión de proteínas del suero sanguíneo de la rata en respuesta a la ICF/RPF sanguínea. Las imágenes se obtuvieron con los registros de los geles individuales introducidos en el software para su análisis. Los puntos seleccionados para su análisis posterior se marcan con círculos.

Se comparó el perfil de proteínas de las cuatro condiciones buscando cambios representativos en el volumen de los puntos de 1h con y sin 24 hs de rpf sanguínea con respecto a los controles, dando preferencia a las proteínas de 50 kDa y de menor peso molecular. Se seleccionaron ocho puntos con diferencias visibles para su análisis (figura 4).

El análisis del perfil de proteínas para la selección de los puntos con cambios de expresión se realizó, en primera instancia de forma empírica con dos observadores independientes, después con el software *image master 2D platinum 7.0*, especializado para obtener el volumen de estos de forma numérica y gráfica (3D) y así medir cambios no identificables en la imagen 2D. Se registraron las características de las proteínas candidatas a funcionar como biomarcadores, incluyendo el peso molecular, pl y la concentración o volumen de cada mancha (tabla 1).

Tabla 1. Intensidad del volumen de los puntos con cambio de expresión con 1h de ICF con y sin 24 hs de rpf sanguínea.

Puntos	Valor de los puntos con cambio de volumen					
	Control	Sham	1h ICF	1h/24 rpf	PM (kDa)	pl
1	33792	13824	24576	16384	14	5.4
2	26624	31232	22528	43520	15	5.1
3	5632	3584	4096	7168	17	5.8
4	54272	9728	8704	31232	14	6.3
5	25600	5120	8192	8192	19	6.5
6	4608	3072	3584	29696	35	5.1
7	33792	23552	17408	14336	37	5.9
8	9728	32768	8192	22528	35	6.0

En la figura 1 se observa como los puntos 1 y 2 disminuyen en condiciones de 1h de ICF, aumentando su volumen con 1h de ICF con RPF sanguínea con respecto a los controles. Mientras que el punto 3 disminuye tanto en 1h de ICF con y sin 24 hs de RPF. El punto 4 disminuye en la condición *sham* y con 1h ICF sin RPF sanguínea con respecto al control normal, pero con 1h ICF y 24 hs de rpf sanguínea tiene un incremento en su intensidad con respecto al control *sham* y a 1h ICF, disminuyendo con respecto al control normal.

En la figura 2 se observa una disminución significativa del volumen del punto número 5 con 1h ICF con 24 hs de RPF sanguínea con respecto al control normal, mientras que en el punto 6 aumenta el volumen con respecto a los controles normal y *sham*.

En el volumen del punto 7 se observa una tendencia a disminuir en la condición de 1h de ICF con respecto a los controles normales y *sham*, mientras que con 1h

ICF y 24 hs de RPF sanguínea también existe disminución en el volumen del punto con respecto al control normal, pero mostrando una mayor cantidad de volumen con respecto a la condición *sham* y 1h ICF (figura 2).

DISCUSIÓN

La enfermedad vascular cerebral es un problema de salud pública generalizado que repercute en grandes costos económicos², lo que hace necesario su estudio para buscar mejores procedimientos preventivos y terapéuticos. Para este fin es fundamental analizar los mecanismos moleculares que expliquen lo que ocurre durante la enfermedad y una estrategia para lograrlo es el estudio de las proteínas a lo largo del proceso¹²⁻¹⁵. Dada la vulnerabilidad de las neuronas ante la isquemia, es importante el tiempo transcurrido entre el inicio de la isquemia, producción de daño, y muerte celular^{16,17}, por lo que en este trabajo se analiza el suero sanguíneo en tiempos tempranos de isquemia cerebral focal, específicamente con 1h de ICF y 1h con 24 hs de RPF sanguínea¹⁸ para ofrecer procedimientos diagnósticos y consecuentemente, tratamientos oportunos antes que el daño surja y se expanda irreversiblemente¹⁹.

En el presente trabajo fue utilizado el modelo de producción de ICF en rata, ya que se pueden reproducir los procesos patofisiológicos que tienen lugar en el humano debido a las semejanzas en la anatomía de la circulación intracraneal de la rata y el hombre, comparada con otros animales, como jirbo, gato o perro²⁰. La ICF se induce por la introducción intracarotídea de un filamento en la arteria cerebral media¹⁰. Con éste procedimiento, se evita la cirugía intracraneal para ligar la arteria cerebral media, donde un porcentaje considerable de los animales muere debido a la cirugía; asimismo, permite estudiar el fenómeno de la reperfusión sanguínea, la cual se logra retirando el filamento de la arteria.

Dado el interés de encontrar marcadores moleculares en un fluido biológico accesible como el suero, en éste estudio se analizaron por medio de electroforésis bidimensional los cambios en el perfil de proteínas del suero sanguíneo. A diferencia de un trabajo previo realizado con suero de cadáveres humanos^{13,17}, en este caso el modelo de estudio fue la rata, a la cual se le indujo controladamente la isquemia cerebral focal con y sin reperfusión sanguínea, lo que permite recuperar muestras de sujetos de los cuales se conoce el tiempo de desarrollo de la interrupción circulatoria y, en su caso, de la restitución de la irrigación. Con este sistema se propone elucidar los primeros cambios que surgen por el evento isquémico antes que la muerte celular ocurra en el tejido cerebral.

Para la electroforésis bidimensional, se probaron

diferentes condiciones, se encontró una resolución apropiada de las proteínas en un rango de pH de 4 a 7¹⁴.

Por otro lado, el porcentaje del gel del acrilamida se uso para resolver mejor las proteínas de bajo peso molecular, ya que éstas serían las primeras en fugarse del tejido cerebral al romperse la barrera hematoencefálica, pasando al líquido cefalorraquídeo y filtrándose después a través de las vellosidades aracnoideas al suero sanguíneo, o bien pasando directamente al torrente circulatorio apareciendo en el plasma de la rata^{13,21}.

Para resolver los perfiles de proteínas se requirió eliminación de las moléculas mayoritarias del suero sanguíneo, albúmina e inmunoglobulinas¹³ mediante columnas que secuestran dichas proteínas, permitiendo la observación de los puntos minoritarios en relación a la concentración de la muestra total, los cuales podrían ser candidatos a biomarcadores^{13,22}.

Las imágenes de los geles se analizaron gráficamente en 3D para cuantificar el cambio de expresión. Se encontraron ocho proteínas de bajo peso molecular (<37kDa) y comparativamente minoritarias, al comparar contra las altamente expresadas como albúmina y fracción de globulinas, que variaron su presencia entre las cuatro condiciones experimentales. Es notable que aparecen variaciones desde la condición *sham* lo que indica que el estrés quirúrgico es capaz de inducir cambios en la presencia de proteínas en el suero. Como perspectiva de este trabajo queda validar el posible papel de biomarcadores de las moléculas descritas en este trabajo, para lo cual será necesaria su identificación por espectrometría de masas y validación de sus cambios de concentración por medio de *western blot* en las cuatro condiciones.

AGRADECIMIENTOS

A Juan García Jiménez y Juan Manuel Ceballos Ramírez. Este trabajo recibió apoyo del proyecto CONACyT: clave # 83866; proyecto del ICyTDF: PIFUTP09-298. Hugo Sánchez Hernández recibe beca de doctorado CONACyT con número de apoyo 209869.

REFERENCIAS

1. Traystman R. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *Ilar* 2003; 44(2):85 95.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Datos y estadísticas; porcentajes de muertes al año alrededor del mundo 2004. [en línea]. <<http://www.who.int/es/>> [Consulta: 01 agosto 2011].
3. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87(1):179 97.
4. Markus HS. Unravelling the Genetics of Ischaemic Stroke. *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000225.
5. Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J. Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf 1 dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2008;20; 432(2):83 7.
6. Mischak H, Apweller R. Clinical proteomics: a need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics CLin Appl* 2007;1:148 56.
7. Lescuyer P, Hochstrasser D, Rabilloud T. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery. *J Proteome Analysis* 2007;6:3371 6.
8. Drake R, Cazares L, Semmes J. Mining the low molecular weight proteome of blood. *Proteomics Clin. Appl* 2007;1:758 68.
9. Montaner J. Tratamiento del ictus isquémico. Valencia, 558, ático 2. España: Marge. 2009.
10. Zea Longa E. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Am Heal Associat* 1989;20:84 91.
11. Ortiz Plata Alma, Nader Kawachi Juan, Guevara Jorge, Sandoval Carlos, Remba Daniel, Jorge Guevara, et al. EGP 314 is expressed differentially in three brain zones at an early time in an experimentally induced ischemia rat model. *Mol Brain* 2005; Res 137:55 62.
12. Vivanco F, López L, Tuñon J, Egido J. Proteómica y enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56(3):289 302.
13. Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, Burgess JA, Walter N, Hochstrasser DF. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem* 2005 nov; 51(11):2043 51.
14. Ionova VG, Lantssova VB, Maximova M Ya, Tkatch EN, Ziganshin RH. Proteomic studies of blood plasma of patients with the ischemic stroke in its most acute period. *Series on Biomechanics* 2012; 27(1 2):59 63.
15. Vivanco F, Mas S, Darde VM, De la Cuesta F, Álvarez Llamas G, G. Vascular proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:1102 22.
16. Herrera M, Gállego J, Muñoz R, Aymerich N, Zandio B. [Reperfusion in acute ischaemic stroke: present and future]. *An Sist Sanit Navar.* 2008; 31 Suppl 1:31 46. Spanish.
17. Sironi L, Tremoli E, Miller I, Guerrini U, Calvio AM, Eberini I, et al. Acute Phase Proteins Before Cerebral Ischemia in Stroke Prone rats: Identification by Proteomics. *Stroke* 2001; 32:753 60.
18. Sánchez HH, Análisis proteómico de las modificaciones producidas por la isquemia cerebral focal en un modelo de rata. México, D.F. Centro de Investigación y de estudios Avanzados del IPN, 2010.
19. Jung CS, Lange B, Zimmermann M, Seifert V. CFS and serum biomarkers focusing on cerebral vasospasm and ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Stroke research and treatment*. 2013;vol. 2013:7.
20. Peña Tapia P. Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna. *Rev Neurol* 2004;39 (11):1011 6.
21. Kotan D, Deniz O, Aygul R, Yildirim A. Acute cerebral ischaemia: relationship between serum and cerebrospinal fluid orexin A concentration and infarct volumen. *Inter Med Res* 2013; 41(2):404 9.
22. Gruden G, Barutta F, Catto I, Bosco G, Caprioli MG, Pinach S, et al. Serum levels og heat shock protein 27 in patients with acute ischemic stroke. *Cell Stress Chaperones* 2013;18:531 3.