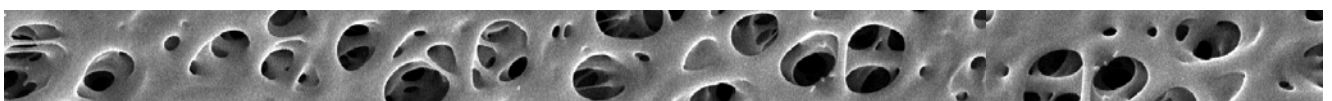


**MICRODIÁLISIS CEREBRAL DE  
ALTA RESOLUCIÓN:  
ESTUDIO DEL PERFIL FUNCIONAL Y  
ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS DE  
100 kDa**

**Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultad de Medicina  
Departamento de Cirugía**

**Trabajo de Investigación (12 créditos)  
Programa de Doctorado 2009-2010  
Convocatoria de septiembre  
AIDA BORRULL MÉNDEZ**

**Dirigido por: Dr. Juan Sahuquillo Barris**



## CERTIFICADO DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**Juan Sahuquillo Barris**, profesor titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, certifica que:

El trabajo titulado "*Microdiálisis cerebral de alta resolución: Estudio del perfil funcional y estructural de las membranas de 100 kDa*", ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada Aida Borrull Méndez, cumpliendo con todos los requisitos necesarios para ser presentado como trabajo de investigación de 12 créditos, dentro del Programa de Doctorado en Cirugía en la convocatoria de septiembre del curso 2009-2010.



Dr. Juan Sahuquillo Barris

Barcelona, 2 de septiembre de 2010

# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>TÍTULO</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
<b>FUNDAMENTOS DE LA MICRODIÁLISIS CEREBRAL</b> .....	<b>9</b>
Tipos de catéteres de microdiálisis cerebral .....	11
Funcionamiento de los catéteres de microdiálisis .....	13
<b>DESCRIPCIÓN DE LAS MEMBRANAS DE 100 kDa</b> .....	<b>15</b>
<b>RECUPERACIÓN RELATIVA DE MOLÉCULAS</b> .....	<b>18</b>
<b>FACTORES QUE AFECTAN A LA RECUPERACIÓN <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>22</b>
Tamaño de poro de la membrana de microdiálisis .....	23
Longitud y área de la membrana de microdiálisis .....	24
Velocidad del líquido de perfusión .....	24
Composición del líquido de perfusión .....	24
Temperatura .....	24
Propiedades de la molécula de estudio .....	25
<i>Naturaleza de la molécula</i> .....	25
<i>Tamaño y estructura de la molécula</i> .....	25
<i>Coefficiente de difusión acuosa de la molécula</i> .....	26
<i>Concentración de la molécula en el medio externo</i> .....	26
<i>Interacción de la molécula con la membrana dializante</i> .....	26
<i>Biofouling</i> .....	26
<b>PROTEOMA CEREBRAL EN LA LESIÓN CEREBRAL AGUDA</b> .....	<b>28</b>
Citocinas de estudio implicadas en la lesión cerebral aguda .....	29
<i>Interleucina-1<math>\beta</math> (1<math>\beta</math>)</i> .....	29
<i>Interleucina-6 (IL-6)</i> .....	31
<i>Interleucina-8 (IL-8)</i> .....	31
<i>Interleucina-10 (IL-10)</i> .....	32
<i>Factor de Necrosis Tumoral-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	33
<b>OTRAS MOLÉCULAS DE ESTUDIO</b> .....	<b>35</b>
Albúmina sérica humana .....	35
Metabolitos energéticos y marcadores de lesión celular .....	36
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>DISEÑO DEL SISTEMA DE MICRODIÁLISIS UTILIZADO PARA EL ESTUDIO <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>39</b>
<b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA</b> .....	<b>42</b>
<b>PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN INICIAL</b> .....	<b>44</b>
Solución inicial para los catéteres 1, 2 y 3 .....	44
Solución inicial para el catéter 4 .....	47

Solución inicial para el catéter 7 .....	48
<b>PROCESO DE RECUPERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO .....</b>	<b>48</b>
<b>DETERMINACIONES DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO. SISTEMA SEARCHLIGHT™ .....</b>	<b>49</b>
<b>PROCESO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ALBÚMINA .....</b>	<b>51</b>
<b>PROCESO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS .....</b>	<b>52</b>
<b>CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN RELATIVA DE LAS MOLÉCULAS DE INTERÉS .....</b>	<b>53</b>
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....</b>	<b>53</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>54</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>PERFIL ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS DE 100 kDa .....</b>	<b>55</b>
Características de la cara externa de la membrana .....	56
Características de la cara interna de la membrana .....	59
Fenómeno de <i>biofouling</i> producido en la cara externa de la membrana .....	60
<b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA .....</b>	<b>61</b>
<b>RECUPERACIÓN RELATIVA DE LAS CITOCINAS DE ESTUDIO .....</b>	<b>63</b>
Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	63
Interleucina-6 (IL-6) .....	66
Interleucina-8 (IL-8) .....	68
Interleucina-10 (IL-10) .....	70
Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	72
Degradación de las citocinas de estudio .....	75
<b>DETERMINACIÓN DE LA ALBÚMINA .....</b>	<b>76</b>
<b>DETERMINACIÓN DE METABOLITOS .....</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA DE 100 kDa .....</b>	<b>85</b>
Tamaño y forma de los poros .....	85
Cara externa de la membrana .....	85
Cara interna de la membrana .....	86
Matriz de la membrana .....	86
<b>FENÓMENO DE <i>BIOFOULING</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA .....</b>	<b>87</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO .....</b>	<b>88</b>
Factores que afectan a la RR de las proteínas .....	88
Recuperación relativa de las citocinas .....	90
<b>RECUPERACIÓN RELATIVA DE LA ALBÚMINA SÉRICA HUMANA .....</b>	<b>91</b>
<b>RECUPERACIÓN RELATIVA DE METABOLITOS .....</b>	<b>92</b>
<b>LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....</b>	<b>93</b>
Procesado de las muestras para microscopía electrónica .....	93
Almacenamiento y degradación de las proteínas diana .....	93
Determinaciones mediante el sistema SearchLight™ .....	94
<b>FUTUROS ESTUDIOS .....</b>	<b>95</b>
Recuperación relativa de las moléculas diana .....	96
Características de la cara externa de la membrana .....	96
Estructura de la cara interna de la membrana .....	96

Características de la matriz de la membrana .....	97
Experimentos de recuperación volumétrica .....	97
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>98</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>101</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Este estudio ha sido posible gracias a la concesión de la beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), con número de expediente PI051092.

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Juan Sahuquillo, director de este proyecto, y a la Dra. M. A. Poca, ya que sin ellos no hubiese podido llevar a cabo el proyecto. Quiero expresar mi gratitud por el gran esfuerzo que han hecho por mí al asesorarme durante todo el largo proceso, en la corrección del trabajo y agradecerles todo lo que me han enseñado.

A mis compañeras de la Unidad: M. Àngels, Tamara, Natalia, Elizabeth, Joana y Mònica por su gran apoyo.

A M. Àngels Merino, por ser una gran compañera y científica que me ha ayudado, asesorado y guiado en todo lo posible y más desde el principio.

A Merche y Lourdes, enfermeras y colaboradoras de la Unidad, por haber estado siempre que las he necesitado.

Al servicio de microscopia electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona y al laboratorio de microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón por su colaboración desinteresada en este estudio.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud y dedicar este trabajo a mi familia y mi pareja, que siempre han estado a mi lado en los momentos más difíciles.

## TÍTULO

---

**MICRODIÁLISIS CEREBRAL DE ALTA RESOLUCIÓN: ESTUDIO DEL PERFIL FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS DE 100 kDa**

## INTRODUCCIÓN

---

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es la primera causa de muerte entre la población menor de 45 años de los países desarrollados (Lucas et al., 2006). Un porcentaje elevado de personas que sufre un TCE acaban padeciendo discapacidades y generando graves problemas familiares, sociales y económicos, dado que la morbilidad y mortalidad de este tipo de pacientes es muy elevada.

Cuando se produce un TCE se generan dos tipos de lesiones, las lesiones cerebrales primarias y las lesiones cerebrales secundarias. Las lesiones primarias, producidas en el momento del traumatismo, son a menudo agravadas por el desarrollo de lesiones secundarias. Las lesiones secundarias se inician minutos, horas o días después de la lesión primaria y desencadenan toda una serie de procesos bioquímicos anómalos que, en último término, derivan en la aparición de una cascada de procesos inflamatorios, que se inician con la liberación de citocinas proinflamatorias y favorecen el desarrollo de edema e isquemia cerebral, procesos que contribuyen al aumento de la presión intracraneal (Lucas et al., 2006). Estos procesos se detectan clínicamente horas e incluso días después de su inicio. El incremento de las lesiones cerebrales derivará en un mal pronóstico del paciente y en un empeoramiento de las secuelas finales. En los últimos años, se ha objetivado que uno de los fenómenos fundamentales que acontecen en la evolución de las lesiones neurotraumáticas es la aparición de mecanismos de neuroinflamación, debido al incremento de la respuesta inmune (Csuka et al., 1999; Kushi et al., 2003).

De forma clásica se considera que las lesiones primarias (fracturas, laceraciones o contusiones cerebrales, entre otras) no pueden ser evitadas. En cambio, las lesiones secundarias son, por definición, potencialmente evitables y tratables. En el momento actual existen múltiples líneas de investigación dirigidas a impedir o contrarrestar los efectos de las cascadas neurotóxicas que se producen en estos pacientes. El tratamiento de los pacientes con un TCE debe dirigirse a la corrección precoz de fenómenos altamente deletéreos en el contexto de estos pacientes como la hipotensión arterial o la hipoxia, intentando mantener en todo momento los



parámetros dentro de un rango fisiológico. La aparición de estos fenómenos en la fase aguda del traumatismo incrementa de forma clara la morbi-mortalidad de los pacientes (Morganti-Kossmann et al., 2002). Sin embargo, en el momento actual sabemos que existen fenómenos menos conocidos como algunas lesiones secundarias que también influyen de forma importante en el resultado final de los pacientes neurotraumáticos.

Las lesiones secundarias a un TCE empiezan inmediatamente después de la lesión primaria y son generadas a causa del inicio de una cascada de procesos que incrementan la alteración ya producida en el parénquima cerebral. Hasta hace unos 10 años se creía que, a diferencia de lo que ocurre a nivel sistémico, el Sistema Nervioso Central (SNC) era un órgano inmunoprivilegiado, al que no le afectaban las respuestas inflamatoria e inmune. No obstante, actualmente se sabe que el SNC no está aislado de este tipo de respuestas, aunque sí difieren del resto del organismo (Chavarria et al., 2004; Lucas et al., 2006). La inflamación es uno de los muchos procesos que se activan después de un TCE y las citocinas son algunas de las moléculas más importantes implicadas en este proceso (Morganti-Kossmann et al., 2002).

Diversos autores han objetivado que después de una lesión cerebral aguda, las citocinas pueden tener acciones reparadoras (citocinas antiinflamatorias) o bien incrementar la lesión (citocinas proinflamatorias) y que existe una relación entre la inflamación y la muerte neuronal (Morganti-Kossmann et al., 2002). Esto explica la importancia de conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos relacionados con las acciones de estas moléculas. Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de las moléculas involucradas en la neuroinflamación es la microdiálisis cerebral. Se trata de una técnica de monitorización de reciente aplicación que permite el muestreo continuo del contenido molecular e iónico del líquido intersticial cerebral *in vivo*, tanto del tejido sano como del lesionado. Esta técnica consiste en la implantación de un fino catéter en el parénquima cerebral humano. El extremo de este catéter dispone de una membrana semipermeable a través de la cual se produce el proceso de microdiálisis y la recuperación de parte de las moléculas del líquido intersticial cerebral.

Si bien la recuperación de moléculas de bajo peso molecular como la glucosa o el lactato supone pocos problemas metodológicos, en diversos estudios realizados mediante microdiálisis cerebral se ha observado que la recuperación de las moléculas de peso molecular (PM) elevado, como las citocinas, se ve influida tanto por los parámetros de la propia membrana de diálisis como por las características de las moléculas de estudio. En general, la concentración de las moléculas en el microdializado recuperado siempre es inferior que su concentración real en el líquido intersticial. Esta variación en la concentración se mide mediante el parámetro de recuperación relativa (RR), que indica la proporción de la concentración real de la molécula de estudio respecto al microdializado (Tisdall et al., 2006). Existen diversos estudios metodológicos que nos permiten estimar la RR de metabolitos convencionales. Sin embargo, la RR de macromoléculas como las citocinas, interleucinas u otras involucradas en los procesos de neuroinflamación no es bien conocida. Por ello, la validez de estudios clínicos sobre los procesos de neuroinflamación mediante técnicas de microdiálisis cerebral exige la realización previa de experimentos de recuperación *in vitro*, con el objeto de conocer mejor los parámetros que influyen en la recuperación de las macromoléculas. La puesta en marcha de estudios clínicos *in vivo* también exige estudiar la recuperación relativa de cada una de las moléculas de interés.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

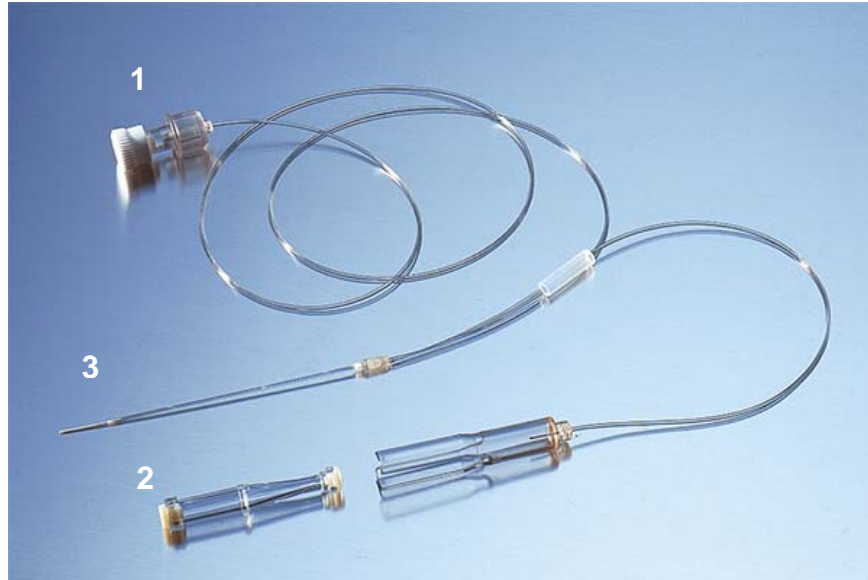
---

En este apartado se revisan los fundamentos teóricos de la microdiálisis cerebral y de la recuperación *in vitro* de macromoléculas, así como el conocimiento actual que existe sobre el estudio del proteoma cerebral en lesiones cerebrales agudas mediante esta técnica.

### FUNDAMENTOS DE LA MICRODIÁLISIS CEREBRAL

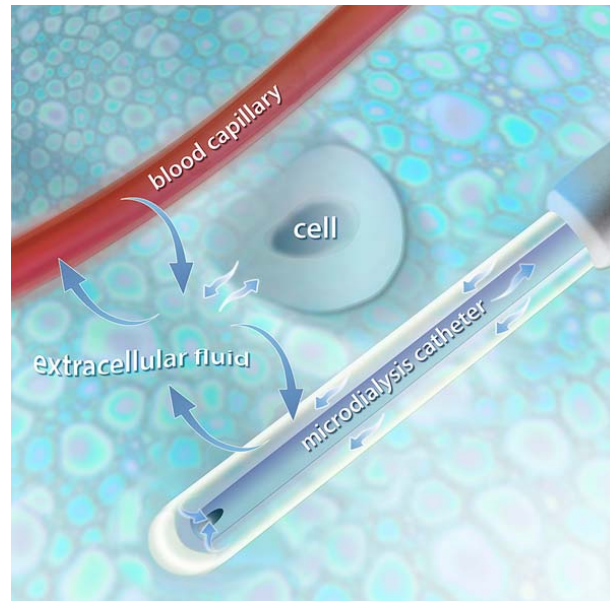
La microdiálisis cerebral es una técnica de neuromonitorización que permite el muestreo continuo del contenido molecular e iónico del espacio intersticial cerebral *in vivo*. Esta técnica fue desarrollada a principios del 1970 y desde entonces ha sido extensamente utilizada en investigación. Fue en 1987 cuando se introdujo su uso en estudios con humanos (Abrahamsson et al., 2005; Hillered et al., 2005; Tisdall et al., 2006). Actualmente se ha implantado de forma rutinaria en muchas unidades de cuidados intensivos para la neuromonitorización de pacientes con lesiones cerebrales agudas tales como traumatismos craneoencefálicos (TCE) (Bellander et al., 2004; Helmy et al., 2009; Hillered et al., 2006). En estas unidades se dispone de analizadores que se utilizan en la cabecera del paciente (CMA600, CMA Microdialysis, Solna, Suecia o ISCUSFlex, CMA Microdialysis, Solna, Suecia), que permiten determinar la concentración de metabolitos como la glucosa, el lactato o el piruvato entre otros, a tiempo casi real.

La técnica de la microdiálisis cerebral se basa en la implantación de un catéter en el parénquima cerebral humano de forma mínimamente invasiva (Bellander et al., 2004). Este catéter dispone de una membrana en su extremo a través de la cual se recupera parte de las moléculas que se encuentran en el líquido intersticial cerebral (**Figura 1**).



**Figura 1. Catéter de microdiálisis.** Uno de los extremos del catéter (1) se conecta a una microbomba de perfusión y el otro extremo a un microvial de recogida (2). En la punta del catéter (3) es donde se encuentra la membrana semipermeable. *Imagen cedida por cortesía de Biogen Científica SL (Madrid, España)*

El principio de las membranas de microdiálisis se basa en la difusión simple de las moléculas a favor de gradiente de concentración a través de una membrana dializante semipermeable (Afinowi et al., 2009). Esta membrana permite la difusión libre de agua y solutos a través suyo. De acuerdo con este principio, las moléculas del espacio intersticial que se encuentren alrededor de la membrana semipermeable podrán pasar por difusión pasiva a favor de gradiente a través de los poros de la membrana hacia el interior del catéter con el mínimo paso de agua (Rosenbloom et al., 2005). En realidad, el intercambio de moléculas se realiza en ambas direcciones y es la diferencia de concentración la que establece la dirección de los solutos. Como el líquido de perfusión no contiene las moléculas de interés, el gradiente de concentración se establecerá del líquido intersticial hacia el interior de la membrana. Su funcionamiento es comparable al de un capilar sanguíneo (**Figura 2**).



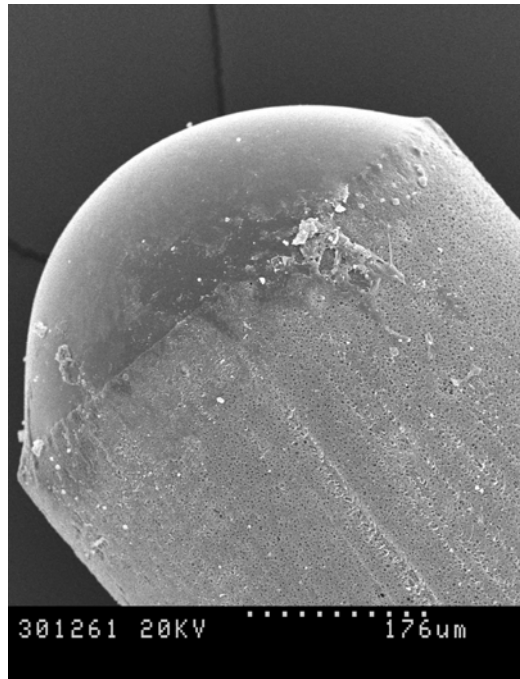
**Figura 2. Similitud entre la membrana de microdiálisis y un capilar sanguíneo.** Imagen cedida por cortesía de CMA Microdialysis, Solna, Suecia

### Tipos de catéteres de microdiálisis cerebral

Existen dos tipos de catéteres de microdiálisis comercializados para la monitorización cerebral, los catéteres CMA70 y CMA71 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia). El catéter CMA70 tiene un tamaño de poro de membrana de 20 kDa y el CMA71 de 100 kDa. El tamaño de poro de membrana o *molecular weight cut-off (MWCO)* indica el peso molecular (PM) en kDa a partir del cual el 80% de las moléculas de ese PM no pueden pasar a través de los poros de la membrana. Los solutos que sean más pequeños que los poros de la membrana podrán difundir hacia el interior del catéter y ser transportados hasta el microvial de recogida gracias al líquido de perfusión. Los solutos de mayor tamaño no pasarán por los poros de la membrana o bien su difusión a través de los poros será tan lenta que su recuperación en el microdializado será casi indetectable (Ao et al., 2006a; Wang et al., 2006).

El catéter CMA70 se utiliza para la recuperación de moléculas de peso molecular pequeño tales como metabolitos (glucosa, lactato, piruvato, glutamato, glicerol y urea) y neurotransmisores. El catéter CMA71, también llamado de alta resolución por su mayor *cut-off* de membrana, permite la recuperación de macromoléculas (de

mayor PM) como mediadores inflamatorios o factores de crecimiento (Hillman et al., 2005). Los dos tipos de catéteres disponen de una punta de oro en el extremo distal de la membrana (**Figura 3**) que permite localizar exactamente el catéter en el tejido cerebral mediante la realización de una tomografía computerizada (TC) cerebral. Las características de cada uno de estos catéteres se resumen en la **Tabla 1**.



**Figura 3.** Imagen de la punta de oro de un catéter de microdiálisis cerebral. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.

También existen membranas de *cut-off* de 3000 kDa que permiten la difusión de moléculas con una mayor recuperación, aunque no están disponibles para uso rutinario (Waelgaard et al., 2006).

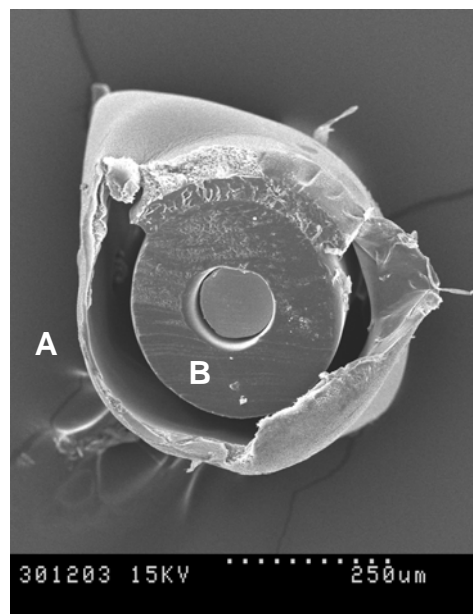
**Tabla 1. Características de los catéteres de microdiálisis cerebral.**

		Material	Longitud (mm)	Diámetro (mm)
<b>Catéter cerebral CMA70</b>	<b>Eje</b>	Poliuretano	60	0,9
	<b>Membrana</b>	Poliamida	10	0,6
	<b>Tubo interno</b>	Poliuretano	600	1,0
	<b>Tubo externo</b>	Poliuretano	220	1,0
<b>Catéter cerebral CMA71</b>	<b>Eje</b>	Poliuretano	60	0,9
	<b>Membrana</b>	Polietersulfona	10	0,6
	<b>Tubo interno</b>	Poliuretano	600	1,0
	<b>Tubo externo</b>	Poliuretano	220	1,0

La diferencia más significativa entre estos dos tipos de catéteres es el material utilizado para la fabricación de la membrana semipermeable, que permite que el tamaño de los poros sea distinto.

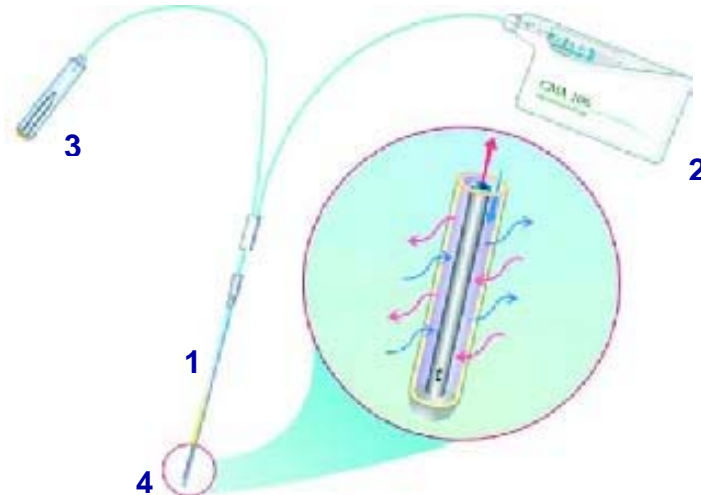
### Funcionamiento de los catéteres de microdiálisis

El catéter de microdiálisis consiste en una sonda de doble luz (**Figura 4**) que en su extremo distal incluye una membrana dializante semipermeable. Esta membrana es la que se inserta en el tejido cerebral.



**Figura 4.** Imagen de un corte transversal del extremo de un catéter de 100 kDa. En esta imagen realizada con microscopía electrónica de barrido, se puede observar la membrana de microdiálisis (A) y el tubo interno del catéter (B).

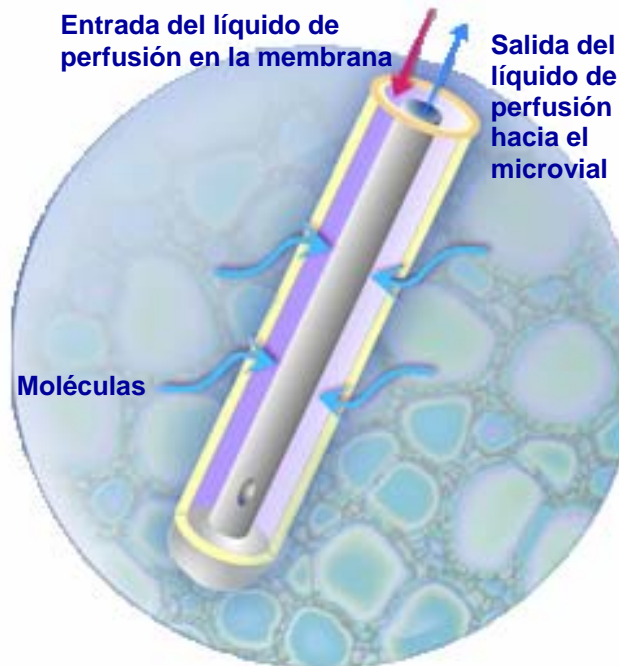
Uno de los extremos del catéter va unido a una microbomba de perfusión de alta precisión y el otro extremo se une al microvial de recogida (**Figura 5**).



**Figura 5. Dibujo esquemático del sistema de microdiálisis.** Este sistema se compone de un catéter de doble tubuladura (1) unido a una bomba de perfusión (2) por uno de sus extremos y a un microvial de recogida (3) por el otro extremo. La membrana de microdiálisis (4) se encuentra en el extremo distal del catéter. *Imagen cedida por cortesía de CMA Microdialysis, Solna, Suecia*

La microbomba va acoplada a una jeringa llena de líquido de perfusión CNS (CMA Microdialysis, Solna, Suecia), un fluido isotónico de composición similar al líquido intersticial cerebral. El líquido de perfusión es conducido por el espacio que existe entre el tubo exterior y el tubo interno hasta llegar a la punta del catéter. Cuando el líquido de perfusión llega a la punta del catéter, el tubo externo finaliza y aparece la membrana semipermeable. En este momento el líquido de perfusión viaja entre la membrana y el tubo interno, siendo en este punto dónde se produce el paso de las moléculas contenidas en el líquido intersticial hacia el interior de la membrana. Una vez dentro, las moléculas son conducidas hacia el lumen del tubo interno hasta llegar finalmente al microvial de recogida, situado en el otro extremo del catéter (**Figura 6**). El CNS normalmente viaja a velocidades de entre 0,1 – 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  (aunque la velocidad de perfusión puede llegar hasta 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (Tisdall et al., 2006; Waelgaard et al., 2006).





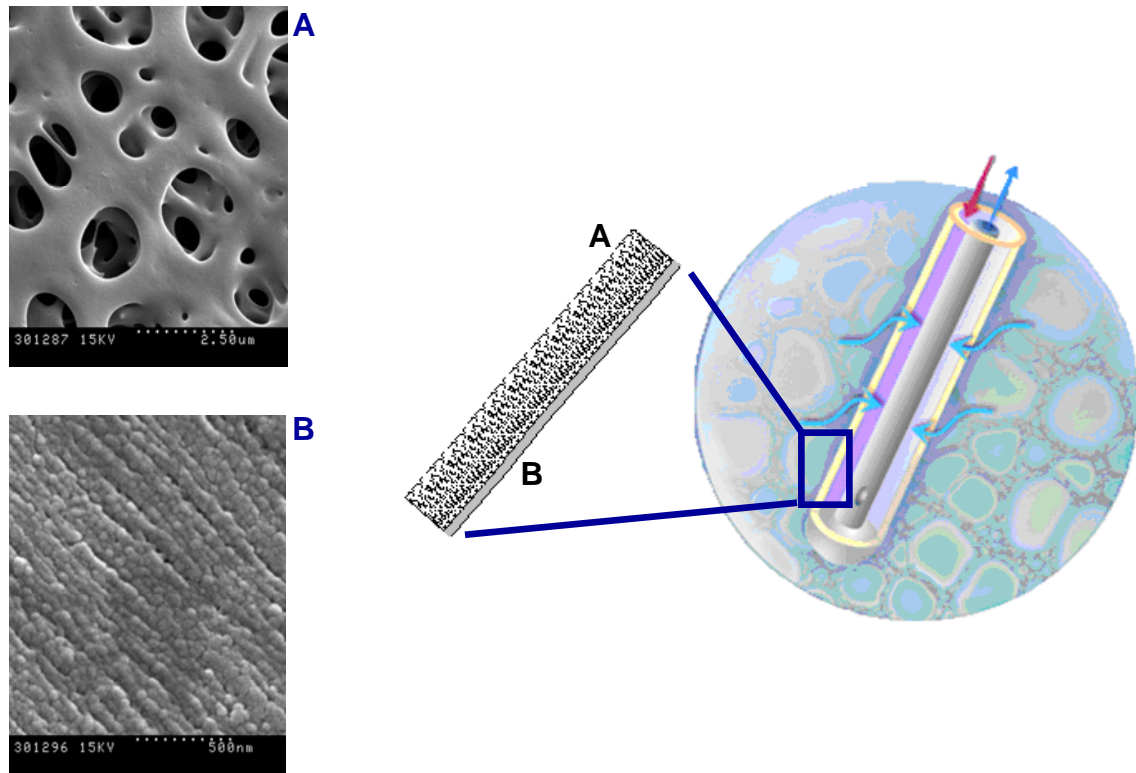
**Figura 6. Esquema del movimiento que sigue el fluido de perfusión.** Es en el extremo del catéter, donde se encuentra la membrana microdializante, el lugar donde se producirá la difusión de los solutos hacia el interior del tubo. *Imagen cedida por cortesía de CMA Microdialysis, Solna, Suecia*

### DESCRIPCIÓN DE LAS MEMBRANAS DE 100 kDa

El interés en la recuperación de moléculas de mayor tamaño, como los mediadores inflamatorios, fomentó el desarrollo de catéteres de mayor tamaño de poro de la membrana. Los catéteres de *cut-off* de 100 kDa son los más utilizados para la recuperación de macromoléculas (Wang et al., 2006). Aunque las membranas de alta resolución permitan la difusión de moléculas de PM mayor, se ha observado que muchas proteínas de 10 kDa o más tienen una baja recuperación (1-5 %) a través de estas membranas a velocidades entre 0,5-1  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Ao et al., 2004; Clough, 2005; Waelgaard et al., 2006).

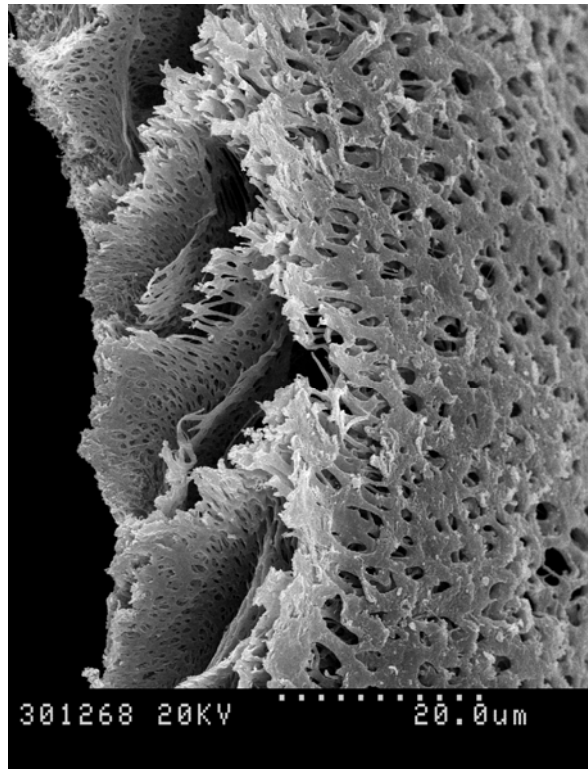
Las membranas de 100 kDa están formadas de polietersulfona (PES), un material que tiene una estructura porosa. La estructura de una membrana de alta resolución consta de una capa externa formada por poros más grandes con un área mediana de  $0,48 \mu\text{m}^2$  (rango:  $0,03\text{-}4,46 \mu\text{m}^2$ ) (**Figura 7a**) y de una capa interna más fina con

poros más pequeños, con un diámetro de alrededor de unos 10 nm (**Figura 7b**) (Helmy et al., 2009). Como se puede observar en la **Figura 7a**, los poros de la capa externa son heterogéneos, de diámetros muy variables formando una estructura tortuosa.



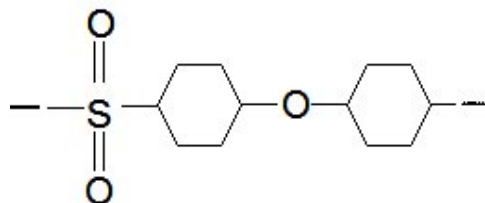
**Figura 7. Esquema de la membrana de 100 kDa.** La membrana de 100 kDa está formada por una matriz porosa externa (A) y por una capa interna de polietersulfona (B). Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

La capa externa de la membrana o matriz porosa presenta cavidades vacías más grandes que los poros (**Figura 8**) (Helmy et al., 2009).



**Figura 8.** Detalle del grosor de la matriz porosa de la membrana de 100 kDa. En la capa externa se pueden observar unas grandes cavidades distribuidas a lo largo de la membrana.

La polietersulfona está formada por grupos sulfonados que le dan a la membrana carga negativa (**Figura 9**).



**Figura 9.** Fórmula química de la polietersulfona (PES).

## RECUPERACIÓN RELATIVA DE MOLÉCULAS

La concentración de una molécula en el microdializado será siempre inferior a la concentración real de esta molécula en el medio externo ya que esta recuperación, en general, se lleva a cabo en condiciones de no equilibrio y, además, existen otros factores que afectan a la recuperación. La proporción de la concentración real de la molécula de estudio respecto al microdializado se calcula mediante la recuperación relativa (Tisdall et al., 2006).

La eficiencia de extracción (EE) o recuperación relativa (RR) de una molécula se mide gracias a la siguiente fórmula (Ao et al., 2004; Ao et al., 2005; Ao et al., 2006b; Wang et al., 2007):

$$EE = \frac{C_d - C_i}{C_e - C_i}$$

$C_d$  es la concentración de la molécula de interés en el dializado  
 $C_i$  es la concentración de la molécula de interés en el líquido de perfusión  
 $C_e$  es la concentración de la molécula de interés en el medio externo

Debido a que, en el caso de este estudio, en el líquido de perfusión la concentración de la molécula de interés ( $C_i$ ) es cero (sólo contiene iones), la ecuación de la eficiencia de extracción se puede expresar como recuperación relativa (RR) de la siguiente forma:

$$RR (\%) = \frac{C_d}{C_e} \cdot 100$$

Existe otro término utilizado en microdiálisis, la recuperación absoluta, que se define como la cantidad de una sustancia recogida en el líquido de salida o microdializado por unidad de tiempo (Benveniste, 1989).

Sin embargo, además de su concentración, la RR de una molécula depende también de otros factores, lo que incrementa la complejidad de la ecuación de la eficiencia de extracción de un determinado metabolito (Ao et al., 2004; Schutte et al., 2004):

$$EE = 1 - \exp \left[ \frac{-1}{Q_d (R_d + R_m + R_e)} \right]$$

$Q_d$  es la velocidad del líquido de perfusión  
 $R_d$ ,  $R_m$  y  $R_e$  son las resistencias al transporte que debe afrontar la molécula de estudio:

- $R_d$  es la resistencia que genera el dializado
- $R_m$  es la resistencia que genera la membrana
- $R_e$  es la resistencia que genera el medio externo

Los parámetros implicados en la ecuación anterior se puede desglosar de la siguiente manera (Schutte et al., 2004; Wang et al., 2006):

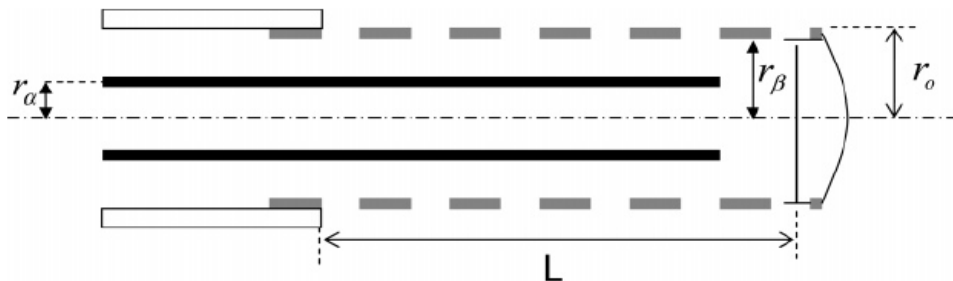
$$R_d = 13 (r_\beta - r_\alpha) / 70\pi L r_\beta D_d$$

$$R_m = \ln(r_0 / r_\beta) / 2\pi L D_m \varnothing_m$$

$$R_e = 0$$

$r_\beta$  es el radio interno de la membrana de microdiálisis  
 $r_\alpha$  es el radio externo de la cánula  
 $r_0$  es el radio externo de la membrana de microdiálisis  
 $L$  es la longitud efectiva de la membrana de microdiálisis  
 $D_d$  es el coeficiente de difusión de la molécula en el dializado  
 $D_m$  es el coeficiente de difusión de la molécula en la membrana  
 $D_m \varnothing_m$  el coeficiente de difusión aparente de la membrana

En la **Figura 10** (Wang et al., 2006) se muestra un esquema de la membrana de microdiálisis incluyendo los parámetros descritos en la ecuación anterior.



**Figura 10. Esquema de la membrana del catéter de microdiálisis.** Donde  $r_\alpha$  es el radio externo de la cánula,  $r_\beta$  es el radio interno de la membrana,  $r_o$  es el radio externo de la membrana y  $L$  es la longitud efectiva de la membrana. Esquema reproducido de Wang, X. y Stenken, J.A. (Wang et al., 2006).

La resistencia del medio externo ( $R_e$ ) será 0 cuando el catéter se perfunda *in vitro*. En el caso que el catéter se implante en el parénquima cerebral vivo, la  $R_e$  será una combinación de otros tres parámetros, lo que también modifica la ecuación de la eficiencia de extracción (Wang et al., 2007).

$$EE = 1 - \exp \left[ \frac{-1}{Q_d (R_d + R_m + R_{bf} + R_{tr} + R_{nt})} \right]$$

$R_{bf}$  es la resistencia que genera la capa de *biofouling*  
 $R_{tr}$  es la resistencia que genera el tejido lesionado  
 $R_{nt}$  es la resistencia que genera el tejido normal

El principio de la diálisis se puede explicar mediante la primera Ley de difusión de Fick, que describe el movimiento pasivo de las moléculas a favor de gradiente de concentración (Bourne, 2003). La Ley de Fick se expresa según la siguiente ecuación (Benveniste, 1989):

$$J = - D \cdot \frac{\delta C}{\delta r}$$

J es el flujo neto  
 D es el coeficiente de difusión acuosa  
 $\delta C$  es la diferencia de concentración de la molécula a ambos lados de la membrana  
 $\delta r$  es la distancia que tiene que atravesar la molécula

La ecuación matemática para predecir la EE de una molécula fue descrita hace unos 20 años por Bungay, Morrison y Dedrick (Bungay et al., 1990). Actualmente, se ha visto que la EE necesita del cálculo previo del coeficiente de difusión acuosa ya que el peso molecular de la molécula de interés (que influirá en su tamaño) y el radio de giración también influyen en la EE (Ao et al., 2006b). El **radio de giración** es un parámetro que describe la conformación de equilibrio de un sistema (molécula). Es la distancia (radio) entre el eje de una molécula en rotación y su centro de giración. Es un indicador de la compactación de la estructura de una proteína (Lobanov et al., 2008) y por lo tanto da una idea del tamaño de la molécula. El coeficiente de difusión acuosa (D) de una molécula se puede estimar con la siguiente ecuación (Ao et al., 2006a):

$$D = \frac{K \cdot T}{\eta \cdot \sqrt{M}^{1/3} \cdot R_G}$$

K es el coeficiente de Boltzmann ( $6,85 \cdot 10^{-15}$ )  
 T es la temperatura, se mide en grados Kelvin  
 $\eta$  es la viscosidad del medio externo, se mide en Pa·s  
 M es el peso molecular, se mide en kg/kmol  
 $R_G$  es el radio de giración de la molécula, en amstrongs (Å)

De acuerdo con estos conceptos, el microdializado sólo contendrá una fracción de la concentración real en el medio externo debido a la gran cantidad de factores que afectan a la recuperación de las moléculas. Esto explica porqué la validez clínica de la microdiálisis cerebral exige controlar el máximo de factores posibles cuando se utiliza esta técnica (Afinowi et al., 2009).

Para poder estudiar *in vivo* el perfil temporal del proteoma en una lesión cerebral aguda y evaluar correctamente la concentración de las moléculas de interés en el líquido extracelular cerebral, es necesario calibrar el catéter de microdiálisis. La forma más simple de calibración de esta técnica consiste en determinar *in vitro* si la molécula de interés es capaz de difundir a través de los poros de la membrana y calcular el porcentaje de recuperación relativa a partir de un medio de concentración conocida para la proteína de estudio. *In vitro* se controlan casi todos los factores que puedan influir en la recuperación y se puede determinar el porcentaje de recuperación de esa molécula. A pesar de esto, se ha observado que la recuperación *in vitro* no se puede extrapolar del todo a los resultados obtenidos *in vivo* debido a que al implantar un catéter de microdiálisis cerebral en el tejido existen otros factores que influyen en la recuperación que no son reproducibles en el laboratorio, como es el fenómeno de *biofouling*, la tortuosidad del tejido, el metabolismo de las moléculas o el intercambio intra y extracelular (Ao et al., 2006a).

### **FACTORES QUE AFECTAN A LA RECUPERACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO***

La recuperación de moléculas a través de las membranas de microdiálisis puede verse afectada por diversos factores. Existen factores que afectarán a la recuperación relativa *in vitro* e *in vivo* (tamaño del poro, longitud y área de la membrana de diálisis, velocidad y composición del líquido de perfusión, temperatura y características de la molécula de estudio), mientras que otros solamente influirán cuando la recuperación sea *in vivo* (efecto de la interacción tisular con la membrana de diálisis).



### Tamaño de poro de la membrana de microdiálisis

Como se ha comentado, las membranas con un *cut-off* de 20 kDa permiten el paso de moléculas de PM pequeño como por ejemplo metabolitos energéticos como la glucosa, el lactato o el piruvato. En cambio, las membranas con un tamaño de poro mayor (membranas de alta resolución, *cut-off* de 100 kDa) permiten el paso de macromoléculas de un mayor PM. Sin embargo, el aumento en el tamaño de poro de la membrana ( $\geq 100$  kDa) para permitir la recuperación de moléculas de mayor PM causa un segundo problema, que no ocurre al utilizar catéteres de menor *cut-off* (20 kDa), es el **fenómeno de la ultrafiltración**. En el caso de las membranas de alta resolución puede suceder que la recuperación se vea afectada por la pérdida de líquido de perfusión hacia el medio externo, especialmente cuando el catéter se perfunde a una velocidad elevada. Esta pérdida de líquido puede diluir la concentración del medio externo, lo que puede alterar la estimación de la concentración real de la molécula de interés en el medio. En el caso de la implantación de estos catéteres en tejido cerebral vivo, el fenómeno de ultrafiltración podría llegar a afectar a la funcionalidad del tejido y estimular cambios en los niveles de las moléculas de interés (Clough, 2005).

Para paliar este fenómeno, diversos autores han demostrado que añadiendo agentes osmóticos en el líquido de perfusión, tales como albúmina sérica o el dextrano, se reduce la pérdida de líquido hacia el medio externo o espacio intersticial cerebral, ya que los agentes osmóticos compensan la diferencia de presiones osmóticas entre el medio externo y el dializado (Ao et al., 2004; Clough, 2005).

A partir de estudios realizados en nuestra unidad, se ha observado que la pérdida de líquido de perfusión al utilizar membranas de microdiálisis de alta resolución se puede evitar si de manera simultánea también se controla la presión hidrostática ejercida en el sistema. De esta forma se puede evitar la adición de albúmina o dextrano en el líquido de perfusión, lo que constituye una ventaja ya que el uso de estos agentes osmóticos no está permitido en estudios *in vivo*. La metodología utilizada para este estudio y los resultados obtenidos se detallan más adelante en los apartados correspondientes.

### **Longitud y área de la membrana de microdiálisis**

La recuperación relativa y absoluta del soluto aumentará en proporción al área de la membrana dializante (Benveniste, 1989). Una mayor longitud de la membrana de microdiálisis implica un incremento en su área y, por tanto, la recuperación relativa de las moléculas.

### **Velocidad del líquido de perfusión**

Este parámetro está inversamente relacionado con la recuperación relativa de las moléculas. A elevadas velocidades del líquido de perfusión, la difusión de las moléculas se ve limitada y se crea un gradiente de presiones hidrostáticas positivas a través de la membrana de dializado que causa una disminución en el transporte de la sustancia (Benveniste, 1989).

### **Composición del líquido de perfusión**

Para que la recuperación relativa sea correcta, el líquido de perfusión no debe contener la molécula de interés (Benveniste, 1989). En el caso que este líquido contenga algún agente osmótico (albúmina o dextrano) la recuperación relativa aumentará. El líquido de perfusión utilizado normalmente es el CNS (CMA Microdialysis, Solna, Suecia) que únicamente contiene iones.

### **Temperatura**

El coeficiente de difusión de una sustancia aumenta un 1-2% por cada °C. Por lo tanto, la recuperación de una molécula a 37°C será mayor que a 22°C debido a la diferente temperatura (Benveniste, 1989).

### ***Coefficiente de difusión acuosa de la molécula***

La recuperación relativa es diferente en cada molécula ya que se ve influida por el peso molecular de la misma, lo que afecta al coeficiente de difusión acuosa (D) de la molécula. Este coeficiente de difusión también depende de la estructura tridimensional de la molécula y del radio de giración (Wang et al., 2006). Además, cuando el catéter se implanta *in vivo*, el coeficiente de difusión también se verá afectado por la tortuosidad del tejido (Benveniste, 1989). Las citocinas, por ejemplo, tienen un coeficiente de difusión acuosa bajo y junto con su elevado peso molecular hace que la recuperación relativa de estas moléculas sea baja (Wang et al., 2007).

### ***Concentración de la molécula en el medio externo***

La recuperación de una molécula depende de la concentración de ésta en el medio externo (Benveniste, 1989). Este hecho debe considerarse en los estudios *in vivo*, en los que puede ocurrir que la concentración de una proteína en el líquido extracelular cerebral se encuentre en unos niveles muy bajos. Esto, añadido a la baja RR de algunas moléculas, puede conducir a que su detección se vea dificultada y se necesiten métodos de detección mucho más sensibles (Ao et al., 2004).

### ***Interacción de la molécula con la membrana dializante***

Los materiales de la membrana pueden interaccionar con las moléculas que pasan a través de los poros por diversos mecanismos, afectando a su transporte y en consecuencia a la recuperación relativa (Benveniste, 1989). Las moléculas pueden quedar adheridas a los poros de la membrana y taponarlos.

### ***Biofouling***

El fenómeno de *biofouling* consiste en la acumulación de material biológico (proteínas y células) en la superficie de la membrana de los catéteres (**Figura 11**) cuando son implantados en el tejido vivo. Esta acumulación puede afectar a la recuperación de las proteínas, ya que los poros de la membrana de microdiálisis se

## Propiedades de la molécula de estudio

Existen diversas características que influirán en el paso de una molécula a través de la membrana de microdiálisis:

### ***Naturaleza de la molécula***

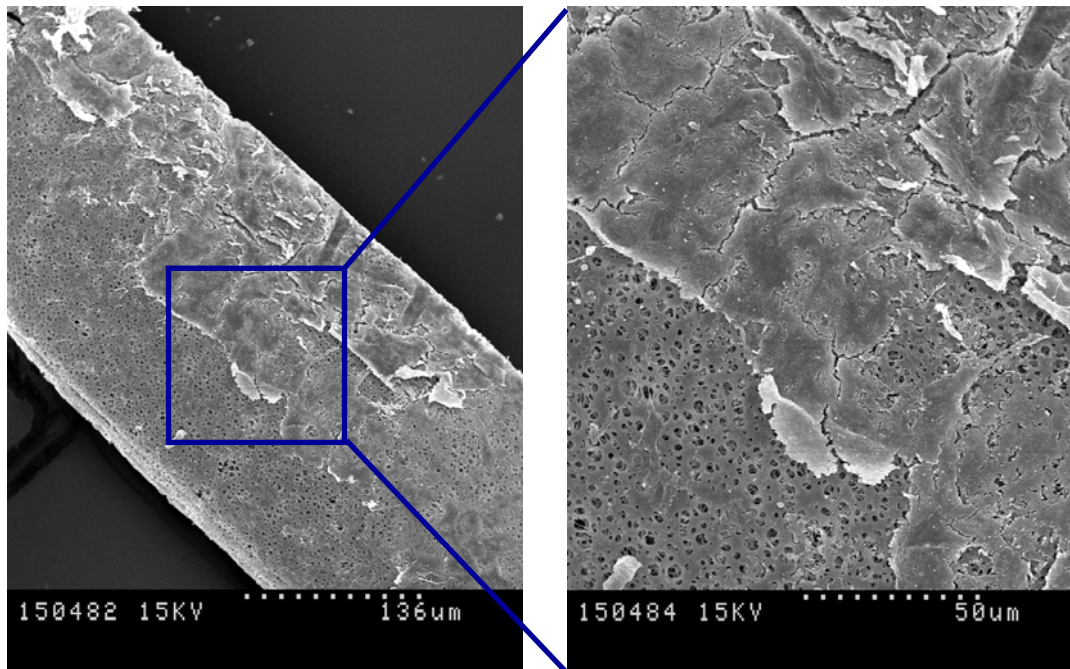
La microdiálisis permite la difusión libre de moléculas de pequeño tamaño y de naturaleza hidrofílica (Ao et al., 2006a). Sin embargo, al intentar recuperar moléculas hidrofóbicas éstas tenderán a quedar adsorbidas en la parte polimérica de la membrana del catéter y del tubo externo. En estudios previos se ha observado que este problema puede evitarse mediante la adición de albúmina sérica bovina en el líquido de perfusión (Ao et al., 2004).

La distribución heterogénea de cargas y el punto isoeléctrico (pI) de una molécula también pueden influir en su recuperación (Wang et al., 2006). El **punto isoeléctrico** es el pH al cual una sustancia tiene carga neta cero. Por debajo de este pH las proteínas tendrán carga positiva y por encima de este pH la carga será negativa.

### ***Tamaño y estructura de la molécula***

A parte del PM de una molécula, la forma y el tamaño de ésta también influyen en la recuperación. La medida macromolecular y la forma (estructura terciaria y radio de giración) pueden restringir la difusión de moléculas grandes a través de los poros de la membrana, cosa que no sucede con las moléculas pequeñas (Wang et al., 2006). El *cut-off* de las membranas de microdiálisis indica qué moléculas pueden pasar a través de los poros según el PM de la misma. Sin embargo, este parámetro no tiene en cuenta la estructura de la molécula, ya que una proteína puede tener un PM menor que el tamaño de poro de la membrana pero su estructura tridimensional puede impedirle el paso a través de los poros.

ocluyen impidiendo su paso a través de la membrana. Este problema se agrava cuanto más tiempo permanece implantado un catéter.



**Figura 11.** Imagen de una membrana de microdiálisis cerebral implantada *in vivo*. En esta imagen se observa la capa de material biológico adherida a la superficie de la membrana (*biofouling*) después de haber sido implantada en el parénquima cerebral. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.

Una vez se ha implantado el catéter en el parénquima cerebral, el primer paso del *biofouling* es la acumulación de proteínas en la membrana, debido al contacto que existe entre ésta y la sangre (Dahlin et al., 2010). En unas horas, las proteínas y otros componentes biológicos se adsorben en los materiales del catéter limitando el paso de las moléculas a través de los poros de la membrana. Al cabo de 24 horas, a esta capa de proteínas se le adhieren células inflamatorias. Finalmente, este tejido se encapsula y se forma un tejido fibroso constituido por varias capas: una capa interna de macrófagos, una capa intermedia de fibroblastos y colágeno y una capa externa de tejido vascularizado (Clapp-Lilly et al., 1999; Wang et al., 2007; Wisniewski et al., 2001).

## PROTEOMA CEREBRAL EN LA LESIÓN CEREBRAL AGUDA

La microdiálisis cerebral de alta resolución permite el estudio *in vitro* e *in vivo* del proteoma cerebral, por lo que constituye una herramienta muy útil para el estudio del perfil temporal del proteoma durante la lesión cerebral aguda. El conocimiento del proteoma y de las citocinas implicadas en las lesiones secundarias que siguen a la lesión cerebral aguda gracias a la microdiálisis permitirá en un futuro desarrollar nuevas y efectivas estrategias terapéuticas. Además, el estudio de los patrones de estas proteínas permitirá predecir el desarrollo de la lesión tisular e influir en su progresión (Mellergard et al., 2008).

Las citocinas son un grupo de polipéptidos que incluye las interleucinas (IL), los interferones (IFN), los factores de necrosis tumoral (TNF), las quimiocinas y los factores de crecimiento. Son proteínas reguladoras y solubles de peso molecular aproximadamente entre 8-80 kDa (Ao et al., 2005) y son producidas por varios tipos de células. Su función es mediar y modular las respuestas inmunológicas, el desarrollo hematopoyético y la comunicación entre células y responden a estímulos infecciosos e inflamatorios. Su actuación puede ser local o sistémica con acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas. Existen dos grupos de citocinas, las pro-inflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-6 (IL-6) que promueven la inflamación, y las anti-inflamatorias, como la interleucina-10 (IL-10), que suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias y reducen la inflamación (Ao et al., 2006a; Ao et al., 2006b; Kushi et al., 2003).

En condiciones normales las citocinas se encuentran a concentraciones muy bajas, casi indetectables, tanto en los fluidos como en los tejidos. Su concentración aumenta al incrementar su expresión en respuesta a algún estímulo, como el daño cerebral y este aumento en sus niveles puede darse horas y días después de la lesión. Estas moléculas son activas a concentraciones del rango de picomoles y femtomoles. Muchas de las citocinas son sintetizadas como precursores inactivos que necesitan ser procesados para tener actividad. Cada citocina puede modular la actividad y la síntesis de otras citocinas mediante una red de regulación muy compleja (Ao et al., 2004; Ao et al., 2006a).

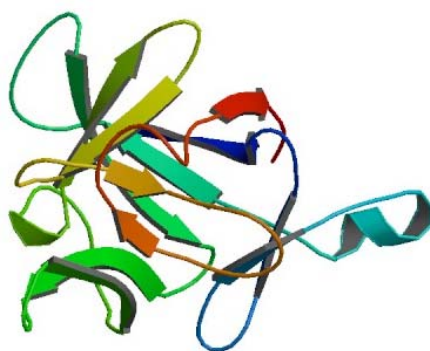
La neurodegeneración aguda es un proceso en el que las neuronas se alteran rápidamente y suelen morir debido a una lesión aguda como la que acontece en los pacientes con lesiones cerebrales agudas como las lesiones neurotraumáticas entre otras. Las lesiones que se producen en las neuronas pueden ocurrir horas y días después de la lesión, debido a que los factores endógenos implicados son liberados de forma retardada en respuesta al daño primario. En general, el Sistema Nervioso Central (SNC) difiere de los otros tejidos en cuanto a la respuesta inflamatoria, que es más débil y lenta. Sin embargo, en ocasiones esta respuesta también puede ser rápidamente inducida, como por ejemplo la expresión y liberación de mediadores inflamatorios como las citocinas (Ao et al., 2006a).

Cuando se produce una lesión cerebral aguda, como en el caso de un TCE, isquemia cerebral, hipoxia o excitotoxicidad, se induce de forma rápida la expresión de las citocinas pro-inflamatorias o neurotóxicas y de las anti-inflamatorias o neuroprotectoras. El perfil temporal de estas moléculas dependerá del tipo de estímulo inicial (Allan et al., 2001; Ao et al., 2006a).

## Citocinas de estudio implicadas en la lesión cerebral aguda

### *Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )*

La interleucina-1 $\beta$  (**Figura 12**), forma parte de la familia de citocinas llamadas IL-1, que incluye la IL-1 $\beta$ , la IL-1 $\alpha$  y el antagonista IL-1ra. Los receptores de los agonistas (IL-1 $\beta$  y IL-1 $\alpha$ ) son la IL-1RI y la IL-1RII (Gosselin et al., 2007; Rothwell et al., 2000). El precursor inactivo de la IL-1 $\beta$  pesa 33 kDa y gracias a la enzima caspasa-1 es escindido para dar lugar a la forma activa de 17 kDa (Abbas et al. 2004; Gosselin et al., 2007) Esta proteína globular está constituida por 153 aminoácidos y no presenta puentes disulfuro (Gu et al., 1991).



**Figura 12. Interleucina-1 $\beta$  humana.** Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB9ILB)

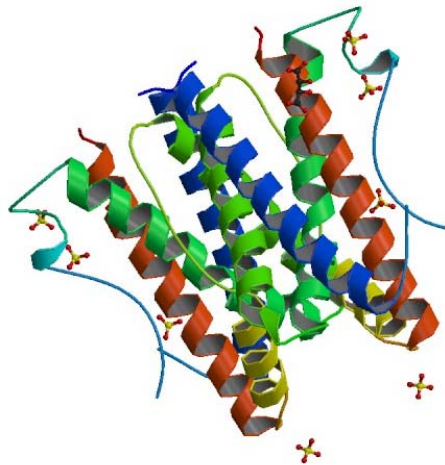
Esta citocina, junto con la IL-1 $\alpha$ , está implicada en la respuesta inflamatoria precoz innata y su actividad es pro-inflamatoria. En condiciones normales se encuentra a bajos niveles, pero su concentración aumenta rápidamente al ser inducida en respuesta a un daño local o periférico (Basu et al., 2004; Rothwell et al., 2000). La expresión de IL-1 $\beta$  se incrementa de forma rápida en respuesta a la isquemia, la hipoxia, la excitotoxicidad y las lesiones traumáticas, lo que genera una gran pérdida de neuronas. Se ha observado que si se inhibe esta interleucina *in vivo* la pérdida de neuronas se reduce considerablemente (Rothwell et al., 2000). La inflamación en el cerebro que se produce después de un TCE puede llevar a un empeoramiento de las lesiones iniciales, potenciando los malos resultados que presentan estos pacientes. En el momento actual se considera que interleucinas como la IL-1 $\beta$ , influyen de manera significativa en este tipo de lesiones (Hutchinson et al., 2007).

El receptor antagonista, IL-1ra, actúa como una molécula antiinflamatoria. Se han realizado estudios en los que se ha observado que el aumento del ratio IL-1ra/IL-1 $\beta$  es un indicador antiinflamatorio, mientras que la disminución de este ratio tiene un efecto pro-inflamatorio (Basu et al., 2004; Hutchinson et al., 2007). La estabilidad de esta interleucina en solución acuosa depende del pH y de la temperatura (Gu et al., 1991).



### **Interleucina-6 (IL-6)**

La interleucina-6 (**Figura 13**) es una molécula pro-inflamatoria. Su forma funcional consta de un homodímero y cada una de las subunidades forma un dominio globular con cuatro hélices  $\alpha$ . Su tamaño está entre 19-26 kDa (Abbas et al. 2004). Al igual que la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , la IL-6 incrementa sus niveles después de un TCE, aunque no de forma tan rápida (Kushi et al., 2003; Morganti-Kossmann et al., 2002).



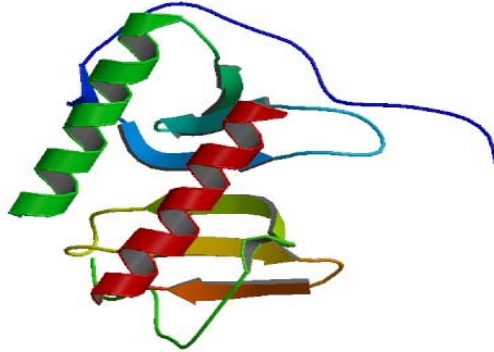
**Figura 13. Interleucina-6 humana.** *Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB1ALU)*

A partir de diversos estudios se ha comprobado que la IL-6 en plasma y en suero es estable al menos durante 8 horas a temperatura ambiente. Esta estabilidad se mantiene cuando las muestras se almacenan a 4°C o congeladas a -20°C y -80°C durante 24 horas (Friebe et al., 2008). Kenis et al. (Kenis et al., 2002) objetivaron que los niveles de IL-6 no variaban cuando las muestras se almacenaban a 4°C, 20°C y 30°C durante 4 días. Sin embargo, al cabo de 11 días de mantener las muestras a 40°C, la concentración de la interleucina disminuía significativamente. A -20°C la IL-6 puede ser almacenada durante varios años.

### **Interleucina-8 (IL-8)**

La IL-8 (**Figura 14**) es una quimiocina proinflamatoria. Sus receptores son CXCR1 y CXCR2. Esta molécula está implicada en la migración de los leucocitos desde el torrente circulatorio hasta la zona lesionada. Según estudios realizados por Friebe

and Volk, (Friebe et al., 2008) la IL-8 en EDTA fue estable durante 8 horas a temperatura ambiente y a 4°C, -20°C y -70°C durante 24 horas.

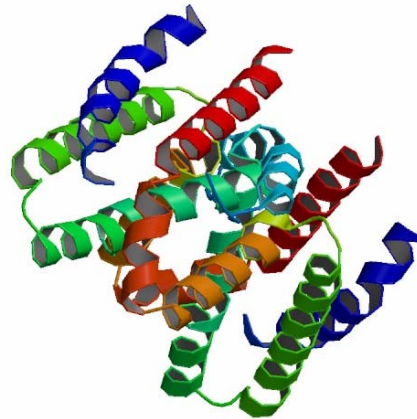


**Figura 14. Interleucina-8 humana.** *Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB1IL8)*

#### ***Interleucina-10 (IL-10)***

La IL-10 (**Figura 15**) es una citocina anti-inflamatoria cuyos niveles aumentan después de un TCE. Es una proteína dimérica no covalente formada por dos subunidades de 17-18 kDa. Su receptor es el IL-10R (Moore et al., 2001; Morganti-Kossmann et al., 2002). Esta interleucina tiene la capacidad de suprimir la expresión de otras citocinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  (Csuka et al., 1999).

Kenis et al. (Kenis et al., 2002) comprobaron que las concentraciones de IL-10 no cambiaban al almacenarla a 4°C pero disminuían significativamente al mantenerla a 20°C durante 14 días y a 30°C y 40°C en tan sólo 1 día. Dados estos resultados, se recomienda mantener esta interleucina almacenada a -70°C, ya que a esta temperatura permanece estable durante varios años.



**Figura 15.** Interleucina-10 humana. *Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB2H24)*

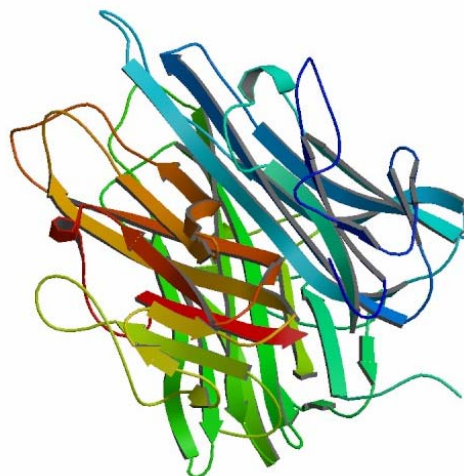
#### **Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  (**Figura 16**) es una citocina pro-inflamatoria secretada por los macrófagos. Se produce como un precursor inactivo de 26 kDa que es modificado por la enzima TNF- $\alpha$  convertasa, expresada en el SNC, dando lugar a su forma activa de 17 kDa que contiene un puente disulfuro. En solución, esta molécula forma un trímero de 52,1 kDa y cada subunidad esta formada por láminas  $\beta$  (Eck et al., 1989; Gosselin et al., 2007).

El TNF- $\alpha$  actúa sobre los receptores TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75). Estos receptores se expresan en el cerebro y comparten algunas vías de señalización con el receptor IL-1RI de la IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  son los primeros mediadores secretados en respuesta al estímulo inflamatorio (Kushi et al., 2003). Los niveles de TNF- $\alpha$  se incrementan rápidamente después de un TCE, gracias a la síntesis mediante las neuronas y las células gliales, y sus niveles disminuyen horas después del traumatismo (Morganti-Kossmann et al., 2002).

Se ha demostrado (Friebe et al., 2008) que el TNF- $\alpha$  en plasma con EDTA permanece estable a temperatura ambiente durante 8 horas. Esta molécula también mantiene su estabilidad durante 24 horas a 4°C o congelada a -20°C y -70°C. Otros estudios realizados por Cruz et al. y Hutchinson et al. (Cruz et al., 1996; Hutchinson et al., 2007) han observado que el TNF- $\alpha$  en líquido cefalorraquídeo se mantiene

estable a  $-70^{\circ}\text{C}$  aproximadamente durante 5 años, manteniéndose al menos el 90 % de la proteína. También concluyeron que a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  la citocina se mantiene estable durante 190 y 90 días respectivamente, conservándose también el 90% de sus valores iniciales.



**Figura 16.** Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  humano. Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB1TNF)

En la tabla siguiente (**Tabla 2**) se resumen las principales características de las moléculas de interés:

**Tabla 2.** Características principales de las moléculas de estudio.

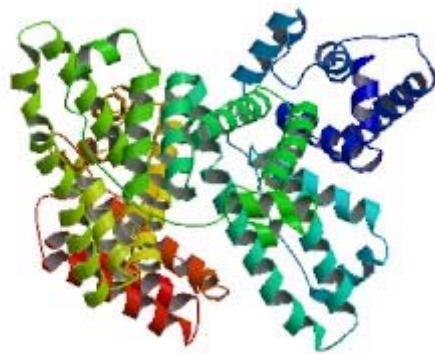
Citocina	Protein Data Bank	PM proteína inactiva (kDa)	PM proteína activa (kDa)	Conformación	Tamaño molécula (AA)	Radio de giración (Å)	pI (Helmy et al., 2009)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	PDB9ILB	33	17,4	Monómero	153	14,608	5,77
<b>IL-6</b>	PDB1ALU	21,1	21,7	Monómero	186	15,993	6,18
<b>IL-8</b>	PDB1IL8	8,4	16,8	Homodímero	72	15,732	9,85
<b>IL-10</b>	PDB2H24	18,7	37,4	Homodímero	160	22,010	7,85
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	PDB1TNF	26	52,1	Homotrímero	157	21,233	7,16

Los radios de giración de las moléculas se calcularon a partir del centro de masas de la molécula, utilizando el programa Yasara (IMBM, University of Graz, Austria and CMBI, Radboud University Nijmegen, the Netherlands). Datos obtenidos de [www.pdb.com](http://www.pdb.com). PM: peso molecular; AA: aminoácidos; pI: punto isoeléctrico

## OTRAS MOLÉCULAS DE ESTUDIO

### Albúmina sérica humana

La albúmina sérica (**Figura 17**) es la proteína más abundante en el plasma humano. Su función principal es regular la presión coloidosmótica y mantener estable el pH sanguíneo. Esta proteína, de carga eléctrica negativa, (Sugio et al., 1999) tiene una capacidad muy elevada de unirse al agua, iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y fármacos. Se trata de un polipéptido sencillo de 585 AA que contiene 17 pares de puentes disulfuro y una cisteína libre. En la **Tabla 3** se resumen las características principales de la albúmina sérica humana.



**Figura 17.** Albúmina sérica humana. Imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB1A06)

**Tabla 3.** Características principales de la albúmina sérica humana.

Protein Data Bank	PM proteína inactiva (kDa)	PM proteína dimerizada (kDa)	Tamaño molécula (AA)	Radio de giración (Å)	pI (Maurer et al., 2003)
PDB1A06	66	133,1	585	35,477	5,92

Datos obtenidos a partir de [www.pdb.com](http://www.pdb.com). PM: peso molecular; AA: Aminoácidos; pI: punto isoeléctrico

### **Metabolitos energéticos y marcadores de lesión celular**

Los metabolitos energéticos que se determinan en este estudio son la glucosa, el lactato y el piruvato, mientras que el glicerol se ha seleccionado como un marcador de lesión celular. En todos los casos se trata de moléculas de bajo peso molecular que pueden recuperarse sin problemas mediante membranas de microdiálisis de 20 kDa por lo que su paso a través de las membranas de alta resolución (*cut-off* de 100 kDa) no se verá afectada por los factores mencionados que afectan a la recuperación de las macromoléculas.

La **glucosa** es la mayor fuente de carbono de las vías metabólicas. Este metabolito genera ATP para suplir la demanda de energía del organismo. Es un marcador importante de los cambios en el metabolismo cerebral (Ungerstedt et al., 2004).

El **lactato** y el **piruvato** se determinan de forma aislada, aunque la información más relevante procede del índice lactato/piruvato (L/P). Este índice indica los cambios energéticos que se producen en las células debido a la isquemia. El piruvato se genera a partir de la glucosa y una vez formado, en presencia de oxígeno, entra en el ciclo de Krebs para producir ATP. En una situación de isquemia (falta de oxígeno) el piruvato no sigue la vía del ciclo de Krebs, sino que se desvía hacia la vía de producción de lactato. Por ello, en situaciones de isquemia el lactato aumentará y los niveles de piruvato disminuirán, lo que producirá un incremento del índice L/P, indicativo de un aumento del metabolismo anaerobio.

El **glicerol** es un componente de la membrana celular. Cuando se produce una lesión en la célula o una falta de energía, la membrana es degradada y el glicerol se libera en el espacio extracelular (Hillered et al., 1998; Tisdall et al., 2006).

## HIPÓTESIS

---

La hipótesis que este estudio pretende verificar o refutar es que la recuperación relativa de las macromoléculas del espacio intersticial cerebral mediante microdiálisis de alta resolución con membranas dializantes de tamaño de poro de membrana (*cut-off*) de 100 kDa es siempre parcial y se ve afectada tanto por las propiedades físicas de la membrana dializante como por las propiedades de la molécula diana.

## OBJETIVOS

---

1. Describir el perfil estructural de las membranas de microdiálisis de alta resolución (*cut-off* de 100 kDa) mediante microscopía electrónica de barrido.
2. Determinar *in vitro* y bajo condiciones controladas y homogéneas, la recuperación relativa (RR) de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ , la albúmina sérica humana y de los metabolitos que se analizan de forma rutinaria a la cabecera del paciente neurocrítico—glucosa, lactato, piruvato y glicerol— con la finalidad de calibrar el sistema y poder validar los resultados que se obtengan con la aplicación de la técnica *in vivo*.
3. En base a los dos primeros objetivos, describir las limitaciones de la técnica en la recuperación de las macromoléculas del espacio intersticial cerebral *in vivo*.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron siete catéteres de microdiálisis cerebral de alta resolución CMA-71 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia), con un tamaño de poro de membrana o *cut-off* de 100 KDa (**Tabla 4**). Cinco de los catéteres se perfundieron utilizando una microbomba CMA106 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia) incorporada en un sistema de recuperación *in vitro* diseñado para simular la implantación de dichos catéteres en el parénquima cerebral humano, en condiciones de estabilidad en la temperatura y con un medio líquido de composición homogénea y constante.

**Tabla 4. Catéteres utilizados y determinaciones realizadas con cada uno**

Catéter	Determinaciones
<b>Catéter 1</b>	Citocinas, Metabolitos, Albúmina
<b>Catéter 2</b>	Citocinas, Metabolitos
<b>Catéter 3</b>	Citocinas, Albúmina
<b>Catéter 4</b>	Citocinas
<b>Catéter 5</b>	Catéter nuevo. Estudio de la estructura mediante microscopía electrónica de barrido
<b>Catéter 6</b>	Catéter nuevo. Estudio de la estructura mediante microscopía electrónica de barrido. Estudio de la recuperación volumétrica con una membrana rasgada.
<b>Catéter 7</b>	Albúmina, Experimentos de recuperación volumétrica

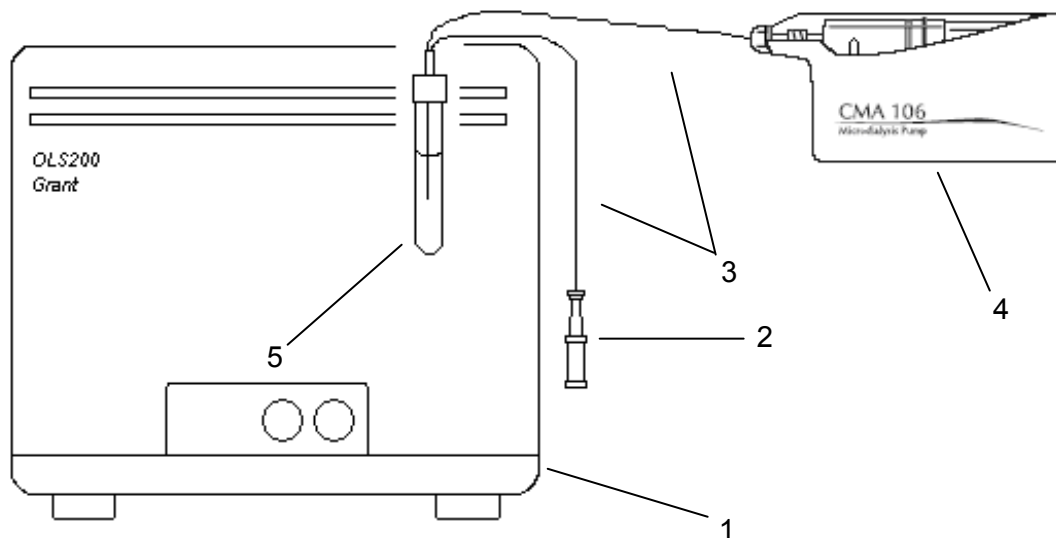
### DISEÑO DEL SISTEMA DE MICRODIÁLISIS UTILIZADO PARA EL ESTUDIO *IN VITRO*

El sistema utilizado para el estudio de la recuperación relativa (RR) con todos sus componentes se esquematiza en las **Figuras 18 y 19**. Los tubos que contenían la solución problema (tubos de cristal BD Vacutainer<sup>®</sup> sin aditivos) se introdujeron en un baño termostático a una temperatura fija de 37°C y con un sistema de agitación a 40 rpm (Grant OLS200, Nirco, Barcelona, España). El objetivo era crear un sistema equivalente a las condiciones que se dan *in vivo*, cuando un catéter de microdiálisis

se implanta en el parénquima cerebral humano. La agitación permite evitar la formación de gradientes de concentración dentro del tubo de la solución problema.



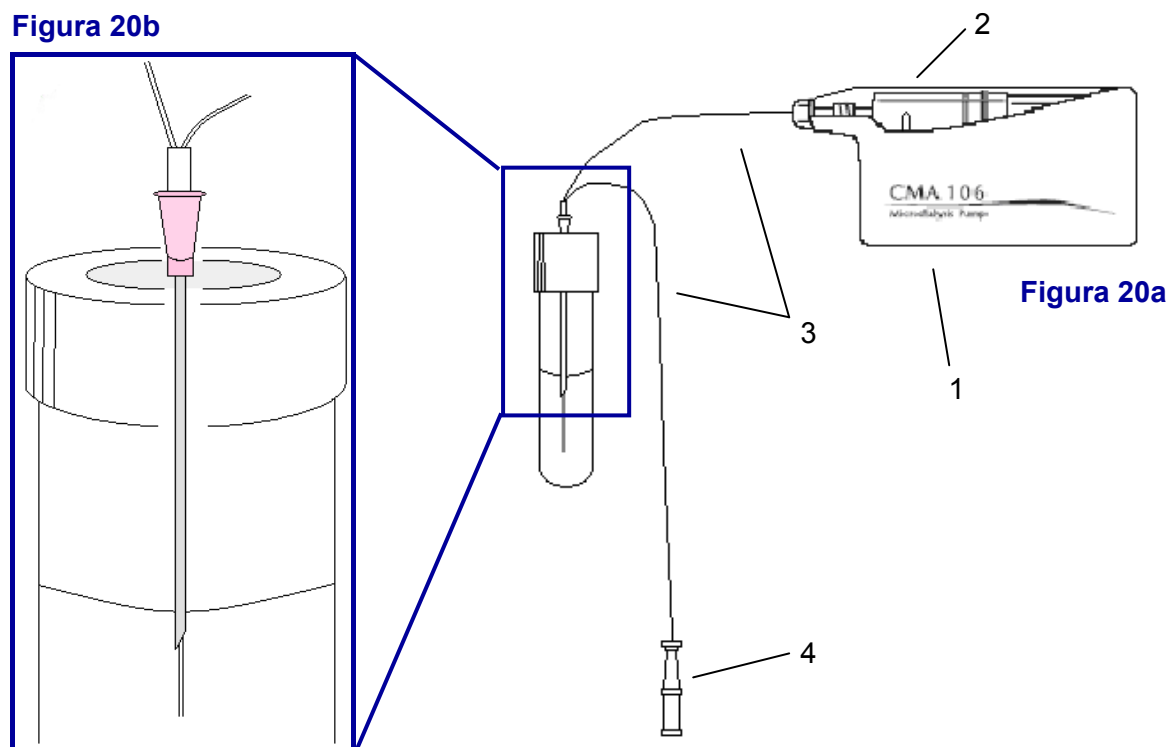
**Figura 18.** Imágenes del sistema de recuperación *in vitro* utilizado. En la imagen de la izquierda se muestra una vista general del montaje. En la imagen de la derecha se muestra un detalle de las bombas de perfusión, los catéteres y los tubos con la solución.



**Figura 19.** Esquema del sistema de microdiálisis *in vitro*. 1) Baño termostático; 2) Microvial; 3) Catéter de microdiálisis CMA71 (*cut-off* 100 kDa); 4) Bomba de perfusión CMA106; 5) Solución inicial

Para permitir el acceso del catéter de microdiálisis al interior del tubo que contenía la solución problema, se introdujo una aguja hipodérmica (BD Microlance™ 3, 1,2 x 40 mm, 18 G) en la parte central del tapón de caucho del tubo. El catéter de microdiálisis (**Figura 20b**) se introdujo en el interior del tubo a través de esta aguja permitiendo, de esta forma, que el catéter no se comprimiese debido a la presión ejercida por la goma del tapón. Además, esto permitió el cierre hermético del tubo

durante todo el proceso, con el fin de evitar pérdidas de fluido por evaporación y una posible contaminación bacteriana durante la manipulación.



**Figura 20a. Esquema del sistema de perfusión.** Este sistema está formado por una bomba de perfusión de velocidad fija (1) cargada con una jeringa con líquido de perfusión (2), por un catéter de microdiálisis CMA71 de tamaño de poro de 100 kDa (3) y por el microvial de recogida (4)

**Figura 20b. Detalle de la introducción del catéter de microdiálisis a través del tubo Vacutainer.** Con ayuda de la aguja se perforó la goma del tapón del tubo y a través de ella se hizo pasar el catéter evitando así la compresión del mismo.

Uno de los extremos del catéter (**Figura 20a**) se conectó al sistema de perfusión, compuesto por una bomba de perfusión de velocidad fija CMA106 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia) con una jeringa cargada con líquido de perfusión CNS (solución artificial de composición similar al líquido intersticial cerebral humano). A través de este mecanismo de infusión (velocidad de perfusión fija de  $0,30 \mu\text{L}/\text{min}$ ), la solución CNS llegó al interior del tubo y de allí al microvial, situado en el otro extremo del catéter de microdiálisis (**Figura 20a**).

La membrana del catéter se introdujo en la solución a una distancia de 22 mm por debajo de la superficie de la solución del tubo. El extremo del catéter que contenía el

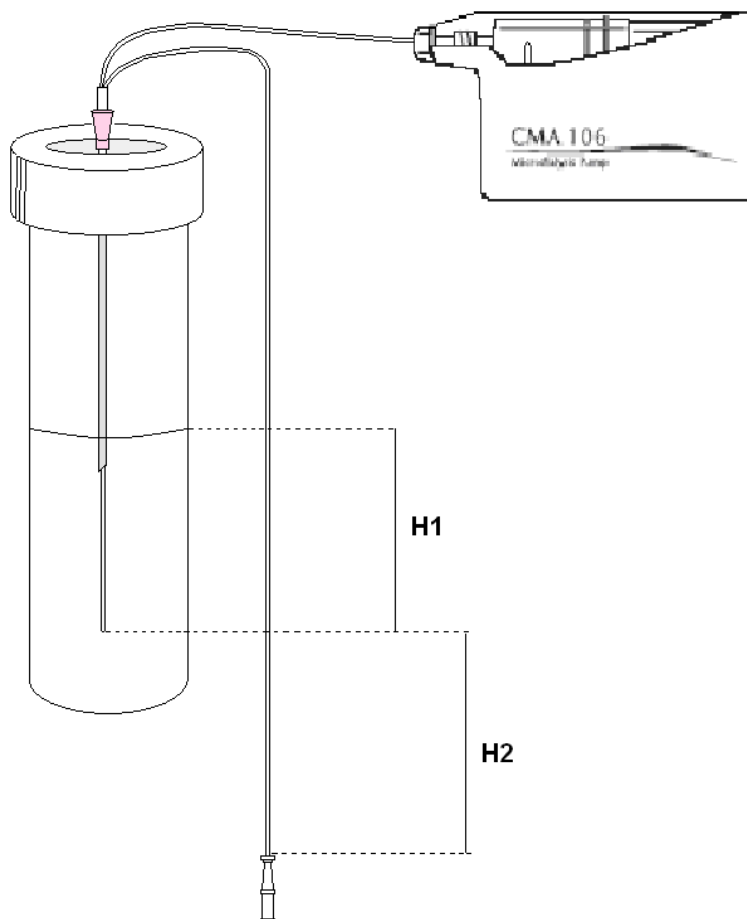
microvial se dispuso fuera del baño termostático a una distancia de 48 mm por debajo de la punta de la membrana dializante (**Figura 21**). Utilizando este método, se consiguió obtener la presión hidrostática adecuada para recuperar en el microvial el mismo volumen infundido por la bomba (18  $\mu\text{L}$ /hora).

## EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA

Con el objetivo de determinar la diferencia de altura entre la punta del catéter y la del microvial (presión hidrostática negativa) a la cual el volumen infundido por la bomba era igual a la cantidad recuperada, se realizaron una serie de experimentos preliminares utilizando un catéter (catéter 7) CMA-71 (*cut-off* de 100 kDa) antes de llevar a cabo el experimento de recuperación relativa de las proteínas de interés.

En una réplica exacta del sistema diseñado para el estudio de las proteínas (**Figura 21**) se mantuvo la membrana del catéter a una distancia fija de 22 mm ( $H_1$ ) respecto a la superficie de la solución del tubo y se realizaron variaciones en la altura del microvial respecto a la punta de la membrana microdializante. De este modo, el microvial se fijó sucesivamente a 50 mm, 45 mm y 40 mm ( $H_2$ ) por debajo de la punta de la membrana dializante y se perfundió durante 8 horas a cada una de las alturas prefijadas. El volumen recuperado se midió en cada una de las alturas y se comparó con el volumen esperado ( $0,30 \mu\text{L}/\text{min} \times 8 \text{ horas} = 144 \mu\text{L}$ ), observando que la altura más adecuada se encontraba entre 45 y 50 mm. Dados estos hallazgos, se realizó un nuevo experimento colocando el microvial a 48 mm, lo que objetivó que a esta distancia el volumen real recuperado era igual al esperado. Los resultados obtenidos mostraban que a 50 mm se recuperaba un 6,53% más del volumen esperado, en cambio, si se colocaba a una distancia de 40 mm la recuperación era de 11,11% menos. En el caso de una distancia de 45 mm la recuperación era de un 2,97% menor al volumen esperado. Al repetir el experimento a 48 mm (distancia media entre las dos distancias que daban el menor error en el volumen recuperado, 45 y 50 mm) el resultado dio un error de 5,42% positivo. Se concluyó, que las dos alturas que proporcionaban un menor error en cuanto al volumen recuperado eran 45 mm y 48 mm. Aunque el error observado a 45 mm fuera un poco menor que a 48 mm se decidió colocar el microvial de recogida a 48

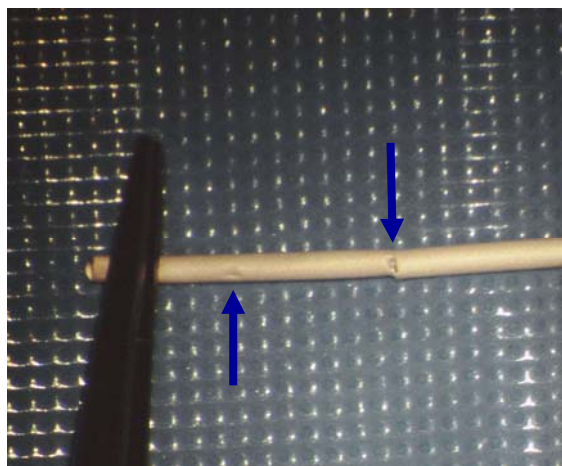
mm de forma que el volumen recuperado nunca estuviese por debajo del volumen esperado (144  $\mu\text{L}$ ) para asegurar siempre volumen suficiente para las determinaciones posteriores.



**Figura 21. Esquema del proceso utilizado para determinar las alturas del sistema.** La punta de la membrana del catéter se colocó a una altura fija de 22 mm (H1) por debajo de la superficie de la solución del tubo. El otro extremo del catéter, el que contenía el microvial, se fue colocando sucesivamente a 55 mm, 50 mm, 45 mm y a 40 mm (H2). Finalmente, se concluyó que la altura adecuada era de 48 mm.

Sin embargo, esta situación de extremo control de los elementos de los experimentos puede no reproducirse cuando se realizan estudios *in vivo*. Existe la posibilidad de que al implantar el catéter de microdialisis en el parénquima cerebral humano la manipulación del mismo y su paso a través de las diferentes estructuras anatómicas produzca alguna alteración en la superficie de la membrana de diálisis

tales como roturas o rasgados. Considerando este aspecto, se decidió realizar un experimento adicional para comprobar cómo estas potenciales alteraciones de la membrana podían influir en la recuperación de las moléculas. Para este nuevo experimento de recuperación se utilizó un catéter de 100 kDa (catéter 6) cuya membrana fue rasgada en dos puntos (**Figura 22**) utilizando una aguja de insulina (BD Micro-Fine™ 0,5 mL, 0,33 mm (29G) x 12,7 mm).



**Figura 22.** Imagen de los cortes realizados a la membrana de microdiálisis de 100 kDa. La membrana de microdiálisis se cortó por dos puntos utilizando una aguja de insulina.

En este experimento se observó una pérdida de líquido a través de la membrana (ver el apartado correspondiente en los resultados) por lo que se analizó si la variación de la distancia del extremo superior del microvial respecto a la punta de la membrana podía compensar esta pérdida de líquido.

## PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN INICIAL

### Solución inicial para los catéteres 1, 2 y 3

Para preparar la solución problema inicial para estudiar la recuperación relativa (RR) de cada macromolécula, para cada uno de los catéteres se utilizaron como base 8,133 mL de líquido de perfusión comercial CNS (distribuido por CMA, Solna, Suecia). El CNS es una solución isotónica estéril de composición similar al líquido intersticial cerebral humano que ha sido especialmente diseñada para su uso en catéteres de microdiálisis cerebral. Este líquido contiene: 147 mmol/L de NaCl, 2,7

mmol/L de KCl, 1,2 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> y 0,85 mmols/L de MgCl<sub>2</sub>. Para la preparación de la solución se utilizó CNS en vez de líquido ceforraquídeo (LCR) humano por las siguientes razones: 1) por la semejanza del CNS al líquido intersticial (fluido muestreado *in vivo* por el catéter de microdiálisis cerebral) y 2) porque el CNS es de composición conocida (sólo contiene iones) y esto permitió añadir directamente la cantidad requerida de metabolitos y proteínas de interés para conseguir la concentración final deseada de la solución problema. La utilización de LCR humano hubiera requerido un procesado adicional: medir previamente la concentración inicial de proteínas contenidas en el LCR para después poder suplementarlo con la concentración necesaria de proteínas hasta alcanzar la concentración deseada.

A los 8,133 mL de CNS se le añadieron 0,17 mL de cada una de las proteínas incluidas en el estudio: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ , obteniendo unas concentraciones en el medio de 32 pg/mL para la IL-1 $\beta$  e IL-6, de 64 pg/mL para la IL-8 y la IL-10 y de 384 pg/mL para el TNF-  $\alpha$ . De esta forma, se consiguió obtener unas concentraciones finales de cada interleucina (IL) dentro del rango de detección del Multiplex SearchLight™ Array (Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU) (**Tabla 5**), presuponiendo, según estudios previos, (Helmy et al., 2009; Hutchinson et al., 2007) que las citocinas tienen una RR de un 20%. Las proteínas utilizadas para preparar la solución problema fueron obtenidas a partir de los estándares reconstituidos de un kit predefinido SearchLight® para la detección de 5 proteínas humanas (Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU).

El protocolo del kit Multiplex SearchLight™ Array incluye la preparación de la curva patrón, es decir, de una curva de referencia que se realiza a partir de la medición de la luminiscencia de 8 estándares (muestras de concentraciones conocidas de cada una de las proteínas). Esta curva permite extrapolar después los valores de luminiscencia obtenidos de las muestras de medio y microdializado y determinar así su concentración.

El protocolo del kit Multiplex SearchLight™ Array incluye la preparación de la curva patrón, es decir, de una curva de referencia que se realiza a partir de la medición de la luminiscencia de 8 estándares (muestras de concentraciones conocidas de cada

una de las proteínas). Esta curva permite extrapolar después los valores de luminiscencia obtenidos de las muestras de medio y microdializado y determinar así su concentración.

**Tabla 5. Curva patrón del kit Multiplex SearchLight™ Array**

Estándar (S)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
<b>S1</b>	200	200	400	400	2400
<b>S2</b>	100	100	200	200	1200
<b>S3</b>	25	25	50	50	300
<b>S4</b>	6,25	6,25	12,50	12,50	75
<b>S5</b>	1,56	1,56	3,125	3,125	18,75
<b>S6</b>	0,39	0,39	0,78	0,78	4,69
<b>S7</b>	0,195	0,195	0,39	0,39	2,34
<b>S8</b>	0	0	0	0	0

La concentración de IL que se consiguió en la solución inicial estaba dentro del rango de detección, concretamente entre los valores indicados en la tabla de los estándares S2 y S3.

Además de las IL ya definidas, para completar la solución se añadieron 0,017 mL de albúmina humana (Grifols<sup>®</sup>, Barcelona, España) para alcanzar una concentración final de 200 mg/L, que es una aproximación de la concentración fisiológica de albúmina que contiene el LCR humano normal (Reiber et al., 2003; Seehusen et al., 2003). Finalmente, se añadieron 8 mL de calibrador A, reactivo del analizador de microdialisis CMA600 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia), que contenía Glucosa, Lactato, Piruvato y Glicerol, resultando unas concentraciones en la solución de 2,6 mM, 1,18 mM, 117,65  $\mu$ M y 223,53  $\mu$ M, respectivamente. Estas concentraciones son similares a las que se pueden encontrar en el líquido intersticial cerebral humano en condiciones fisiológicas (**Tabla 6**) (Reinstrup et al., 2000).



Tabla 6. Composición de la solución problema

Componentes de la solución problema	Volumen (mL)	Concentración
<b>CNS</b>	8,133	---
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0,17	32 pg/mL
<b>IL-6</b>	0,17	32 pg/mL
<b>IL-8</b>	0,17	64 pg/mL
<b>IL-10</b>	0,17	64 pg/mL
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,17	384 pg/mL
<b>Glucosa (Calibrador A)</b>	8	2,6 mM
<b>Piruvato (Calibrador A)</b>	8	117,7 $\mu$ M
<b>Lactato (Calibrador A)</b>	8	1,2 mM
<b>Glicerol (Calibrador A)</b>	8	223,5 $\mu$ M
<b>Albúmina</b>	0,017	200 mg/L

A la base de la solución problema (CNS) se le añadieron las proteínas de estudio, albúmina humana y calibrador A (solución de la máquina de microdiálisis que contiene glucosa, piruvato, lactato y glicerol).

La solución de estudio obtenida fue distribuida en cinco tubos de cristal BD Vacutainer<sup>®</sup> de un volumen de 5 mL sin ningún tipo de aditivo. En ellos se depositaron 3 mL de solución problema por tubo y se almacenaron a -80°C. El proceso de preparación de la solución problema se llevó a cabo en condiciones estériles y dentro de una campana de flujo laminar para evitar el crecimiento bacteriano que podría afectar a la RR de las proteínas y de los metabolitos de interés.

En el caso del catéter 3, tanto los tubos que contenían la solución inicial como los microviales obtenidos con el microdializado y las muestras de solución inicial fueron almacenados a 4°C con el objetivo de determinar si la temperatura afectaba a la estabilidad de las muestras.

#### **Solución inicial para el catéter 4**

Según los resultados obtenidos en los catéteres 1, 2 y 3 (detallados más adelante en el apartado correspondiente), para la preparación de la solución problema inicial para la recuperación de este catéter se decidió aumentar la concentración de las

citocinas de estudio. Se utilizaron 6,183 mL de CNS al cual se le añadieron 8 mL de calibrador A y 0,017 mL de albúmina sérica humana. Las cantidades añadidas de cada citocina y las concentraciones obtenidas se detallan en la **Tabla 7**. El resto del procedimiento se llevó a cabo de la misma forma que en los catéteres 1, 2 y 3.

**Tabla 7. Concentraciones de las citocinas en la solución inicial del catéter 4**

Citocina	Volumen (mL)	Concentración (pg/mL)
IL-1 $\beta$	0,5	94,12
IL-6	0,53	99,76
IL-8	0,53	199,53
IL-10	0,7	263,53
TNF- $\alpha$	0,54	1219,76

### **Solución inicial para el catéter 7**

La solución inicial de este catéter se preparo utilizando 16,915 mL de CNS al cual se le añadieron 0,085 mL de albúmina sérica humana para conseguir una concentración final de 1000 mg/L de albúmina. Este catéter se utilizó para el estudio de la recuperación relativa de la albúmina y para los experimentos de recuperación volumétrica.

### **PROCESO DE RECUPERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO**

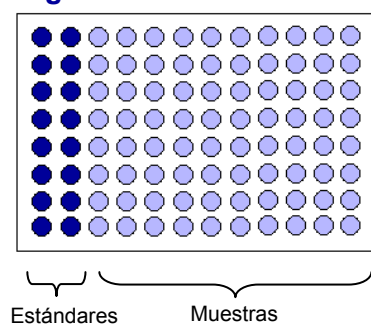
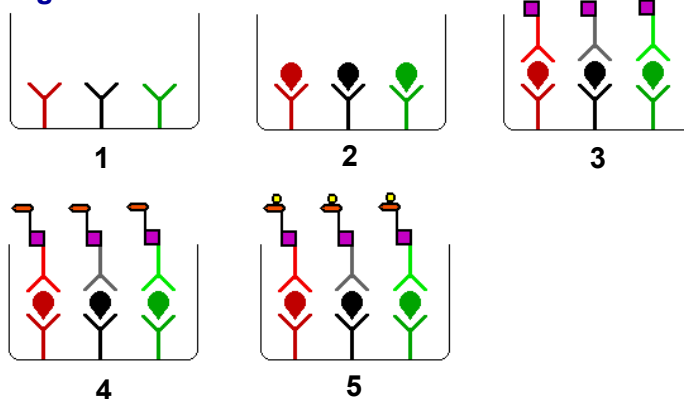
Al iniciar el experimento, se realizó un periodo de 30 minutos de perfusión con el fin de estabilizar el sistema. Pasado este tiempo, el microvial insertado se descartó y se colocó el primer microvial utilizado para el experimento. Cada catéter se perfundió durante 5 días (120 horas) y los microviales se sustituyeron cada 8 horas, obteniendo un volumen final por microvial de 144  $\mu$ L, excepto en los catéteres 4 y 7 que los microviales se sustituyeron cada 12 horas, obteniendo un volumen final de 216  $\mu$ L por microvial. Todos los microviales recuperados se almacenaron inicialmente en contenedores especiales a -20°C y, terminados los 5 días del experimento, se almacenaron en un congelador a -80°C.

El tubo que contenía la solución inicial se sustituyó cada 24 horas con el fin de evitar variaciones en la solución tales como pérdida de volumen por evaporación (con la consiguiente variación en la presión hidrostática y en la concentración de las proteínas) o la degradación de las proteínas diana, debido a la temperatura del agua del baño. Todos los tubos sustituidos fueron estudiados desde un punto de vista microbiológico, para comprobar la esterilidad del contenido y detectar si se había producido crecimiento bacteriano durante la manipulación de los tubos y del circuito de recuperación. Para el estudio de esterilidad, la solución se trató de forma idéntica al LCR humano, realizándose cultivos específicos para la detección de microorganismos aerobios y anaerobios.

Además de recoger el microdializado obtenido a partir de la perfusión del catéter, cada vez que se cambiaba el microvial y cada vez que se sustituía el tubo de la solución inicial, se extrajo una muestra de la solución directamente del tubo, con el objetivo de comparar los valores de concentración obtenidos en el microdializado recuperado con los valores iniciales de la solución. Este análisis comparativo permitía determinar el porcentaje de recuperación relativa de cada proteína diana. Por otro lado, el análisis de la solución inicial en varios puntos temporales permitió determinar si se habían producido cambios significativos en la solución debido a la evaporación o a otros factores no controlados.

## **DETERMINACIONES DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO. SISTEMA SEARCHLIGHT™**

El array proteómico Multiplex SearchLight™ *Human Custom* (Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU) es un ELISA múltiple (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de 96 pocillos que permite la medición cuantitativa simultánea de diversas proteínas diana. Cada pocillo de la microplaca lleva previamente fijados los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas de interés (**Figura 23b**).

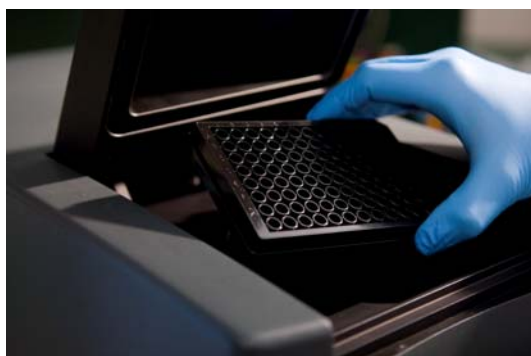
**Figura 23a****Figura 23b**

**Figura 23a. Esquema del array proteómico Multiplex SearchLight™ Human Custom.** En las dos primeras columnas se añadieron las muestras correspondientes a los estándares y en el resto de pocillos se añadieron las muestras correspondientes a la solución problema y a los microdializados recuperados. Todas las muestras se añadieron a una dilución 1:2 y por duplicado.

**Figura 23b. Esquema del Sistema SearchLight para la detección de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ :** 1) Cada uno de los pocillos de la placa lleva previamente fijados los anticuerpos contra cada una de las cinco proteínas; 2) Las proteínas contenidas en los estándares y las muestras de medio y microdializado se unen a sus respectivos anticuerpos; 3) Se añade una mezcla de anticuerpos biotinilados que se unen a un segundo epítipo de las proteínas; 4) Se añade el complejo Streptavidina-HRP que se une al anticuerpo biotinilado; 5) Finalmente, se añade el sustrato SuperSignal® ELISA que al reaccionar con la enzima produce una señal luminiscente. Esta señal se mide con la cámara SearchLight CCD y permite calcular la concentración de cada proteína en las muestras iniciales.

Siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial, las muestras y los estándares se diluyeron a una dilución 1:2 y se añadieron a sus respectivos pocillos de la placa (50  $\mu$ L/pocillo) por duplicado para reducir el error (**Figura 23a**). Después de 1 hora de incubación, los anticuerpos capturan las proteínas específicas tanto de los estándares como de las muestras. Una vez realizada esta primera incubación, se realizaron tres lavados de la placa con *Wash Buffer* (tampón de lavado) para eliminar las proteínas no unidas y se añadió a cada pocillo una mezcla de anticuerpos biotinilados, que se unieron a un segundo lugar de unión (epítipo) de la proteína diana tras un tiempo de incubación de 30 minutos. Después de la incubación se realizaron otros tres lavados con *Wash Buffer* para eliminar el exceso de anticuerpos y se añadió a cada pocillo el complejo Streptavidina-HRP (SearchLight™ Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU) realizando otra incubación de 30 minutos. Esta enzima reacciona con una gran variedad de sustratos y produce una señal lumínica. Una vez finalizada la incubación, la placa se lavó tres veces más y se añadió el sustrato SuperSignal® ELISA a cada pocillo (SearchLight™ Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU). La reacción

con esta enzima-sustrato produce una señal luminiscente. La luminiscencia producida en cada pocillo se midió al mismo tiempo utilizando una cámara SearchLight™ CCD refrigerada. Para calcular las concentraciones de proteínas en cada muestra se utilizó el programa Array Vision™ incorporado al sistema SearchLight (Figura 24a y 24b). La cantidad de señal luminiscente producida en este método es proporcional a la cantidad de proteína contenida en las muestras iniciales y en los estándares.



**Figura 24a**



**Figura 24b**

---

**Figura 24a.** Fotografía del SearchLight CCD Imaging & Analysis System. Imagen cedida por cortesía de Aushon BioSystems Inc. (Billerica, Massachusetts, EUA)

**Figura 24b.** Imagen obtenida mediante el sistema de análisis SearchLight CCD. Este sistema mide la luminiscencia de las muestras mediante la realización de una fotografía de los pocillos de la placa analizada.

## PROCESO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ALBÚMINA

Para la determinación de la albúmina, los microviales se analizaron mediante la técnica del verde de bromocresol (BCG) con el analizador inmunoquímico OLYMPUS® AU5400™ Chemistry-Immuno Analyzer (Olympus America Inc., Diagnostic Systems Group, Melville, New York). Este procedimiento está basado en la capacidad de la albúmina para unirse a determinados colorantes. En este caso específico, la albúmina se une al verde de bromocresol. El analizador OLYMPUS® AU5400™ determina la absorbancia del complejo albumina-BCG formado a una longitud de onda de 630 nm. La absorbancia se incrementa cuando la albúmina se une al BCG y por lo tanto, ésta es proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra (Duly et al., 2003). El rango de detección de la albúmina de este analizador es de 5-300 mg/L.

## PROCESO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

Con la finalidad de determinar la concentración de glucosa, lactato, piruvato y glicerol de las muestras de solución inicial y de los microviales recuperados se utilizó el analizador enzimático de microdiálisis CMA600 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia). Cada una de estas determinaciones consiste en una serie de reacciones enzimáticas específicas (**Tabla 8**) que se miden por un sistema colorimétrico. Todas ellas dan lugar a la quinoneimina, compuesto de color rojo-violeta y es esta coloración la que se mide fotométricamente a una longitud de onda de 530 nm. La concentración de los metabolitos es proporcional a la absorbancia.

**Tabla 8. Reacciones llevadas a cabo por el analizador enzimático de microdiálisis CMA600 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia).**

REACTIVO	REACCIÓN
<b>Glucosa</b>	$D\text{-glucosa} + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{gluconolactona} + H_2O_2$
	$H_2O_2 + \text{fenol} + 4\text{-amino-antipirina} \xrightarrow{POD} \text{quinoneimina} + 4 H_2O$
<b>Lactato</b>	$L\text{-Lactato} + O_2 \xrightarrow{LOD} \text{piruvato} + H_2O_2$
	$H_2O_2 + 4\text{-cloro-fenol} + 4\text{-amino-antipirina} \xrightarrow{POD} \text{quinoneimina} + 2 H_2O + HCl$
<b>Piruvato</b>	$\text{Piruvato} + O_2 + \text{fosfato inorgánico} \xrightarrow{PirOx} \text{Acetilfosfato} + CO_2 + H_2O_2$
	$H_2O_2 + TOOS + 4\text{-amino-antipireno} \xrightarrow{POD} \text{quinonediimina} + 4 H_2O$
<b>Glicerol</b>	$\text{Glicerol} + ATP \xrightarrow{GK} \text{glicerol-3-fosfato} + ADP$
	$\text{Glicerol-3-fosfato} + O_2 \xrightarrow{GPO} \text{dihidroxiacetona fosfato} + H_2O_2$
	$H_2O_2 + DCHBS + 4\text{-amino-antipirina} \xrightarrow{POD} \text{ACBS} + 2 H_2O + HCl$

Cada una de estas reacciones produce quinoneimina, un compuesto cuya coloración es la que se mide a 630 nm.

Los rangos de detección del analizador enzimático CMA600 de los metabolitos de estudio son: glucosa: 0,1 mmol/L-25 mmol/L; lactato: 0,1 mmol/L-12 mmol/L; piruvato: 10  $\mu\text{mol/L}$ -1,5 mmol/L y glicerol: 10  $\mu\text{mol/L}$ -1500  $\mu\text{mol/L}$ . La variabilidad intra e interensayo de la técnica se detallan en la **Tabla 9**. Los valores de recuperación relativa proporcionados por CMA Microdialysis (CMA Microdialysis, Solna Suecia) son: glucosa: de 2 a 20 mmol/L RR del 103% (rango 88,2-112,6 %); lactato: de 0,44 a 7,5 mmol/L RR del 96% (rango 74-114%); piruvato: de 125 a 250  $\mu\text{mol/L}$  RR del 106 % (rango 104,7-108,1%) y glicerol: de 125 a 650  $\mu\text{mol/L}$  RR de 104 % (rango 91-114%).

Tabla 9. Variabilidad intra e interensayo del analizador CMA600

METABOLITO	CONCENTRACIÓN (mediana)	VARIABILIDAD INTRAENSAYO		VARIABILIDAD INTERENSAYO		TOTAL	
		SD	%	SD	%	SD	%
Glucosa (mmol/L)	1,30	0,030	2,3	0,033	2,6	0,044	3,4
	5,30	0,153	2,9	0,147	2,8	0,210	4,0
	15,61	0,313	2,0	0,390	2,5	0,494	3,2
Lactato (mmol/L)	0,79	0,021	2,7	0,031	4,0	0,037	4,7
	3,16	0,082	2,6	0,068	2,1	0,106	3,4
	9,13	0,148	1,6	0,201	2,2	0,246	2,7
Piruvato ( $\mu$ mol/L)	53,2	2,9	5,4	5,1	9,6	5,8	10,9
	229	6,0	2,6	7,2	3,2	9,3	4,0
	685	24,5	3,6	23,4	3,4	33,6	4,9
Glicerol ( $\mu$ mol/L)	67,5	2,2	3,2	3,7	5,4	4,2	6,2
	260	6,7	2,6	8,4	3,2	10,6	4,1
	810	18,9	2,3	17,5	2,2	25,5	3,2

Los valores hacen referencia a los resultados obtenidos de 20 determinaciones de 100 muestras por cada metabolito. Valores proporcionados por (CMA Microdialysis, Solna, Suecia). SD: Desviación estándar

## CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN RELATIVA DE LAS MOLÉCULAS DE INTERÉS

El cálculo de la recuperación relativa (RR) de los metabolitos de estudio (glucosa, lactato, piruvato y glicerol), citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ ) y albúmina, se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$RR = \frac{\text{Concentración de la molécula en el microdializado (Cd)}}{\text{Concentración de la molécula en la solución inicial (Ce)}} \cdot 100$$

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Con el objetivo de estudiar el perfil estructural de los catéteres de microdiálisis cerebral de *cut-off* de 100 kDa y las posibles adherencias de las proteínas a la superficie de la membrana, los catéteres utilizados en los experimentos de recuperación se observaron mediante microscopía electrónica de barrido o *scanning electron microscope* (SEM). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570 (Hitachi LTD, Tokio, Japón) de resolución 3,5 nm y 20-20.000 aumentos.

Una vez finalizados los 5 días de recuperación con cada catéter, éstos se introdujeron en una solución de paraformaldehído y glutaraldehído al 2% y 4%, respectivamente para fijarlos y así conservar las moléculas biológicas que pudieran haberse adherido a la superficie del mismo. De cada catéter se hicieron cortes transversales y longitudinales, para estudiar la superficie de la membrana y la parte interna del catéter. Una vez cortados, los especímenes se llevaron al servicio de microscopía electrónica donde fueron procesados y recubiertos con una película de oro para la posterior observación al microscopio. A partir de las imágenes obtenidas se hicieron análisis mediante el programa ImageJ 1.37v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) para determinar el grosor de la membrana dializante y el área y densidad de los poros de la cara externa de la membrana.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el programa SPSS v15 (SPSS, Inc a IBM Company, Chicago, Illinois, EUA). Para determinar si las variables seguían o no una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que seguían una distribución normal se resumieron mediante la media  $\pm$  una desviación estándar (DS). Para las variables que no seguían una distribución normal se utilizó la mediana y el rango (mínimo-máximo). Debido al tamaño muestral, en la comparación de grupos se utilizaron pruebas no paramétricas (test de Mann-Whitney para muestras independientes y test de Wilcoxon y test de Friedman para dos o más muestras relacionadas). Se consideró estadísticamente significativo un nivel de confianza superior al 95% ( $p < 0,05$ ).



## RESULTADOS

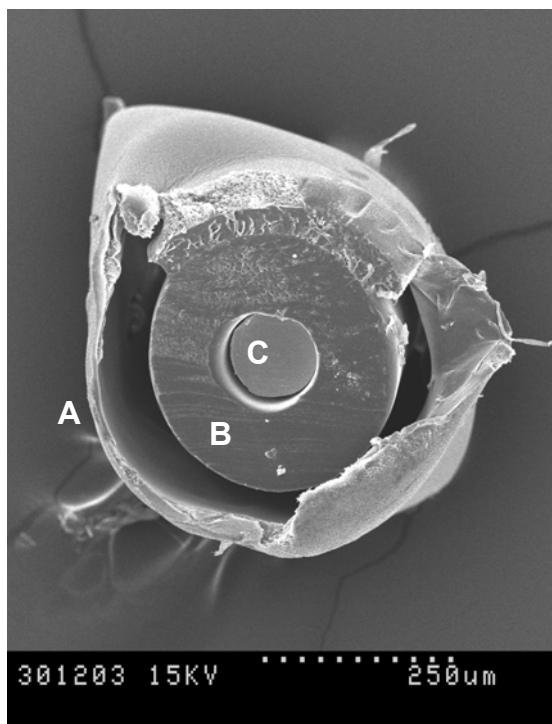
---

Para los experimentos de recuperación relativa (RR) se utilizaron cinco catéteres de *cut-off* de 100 kDa (catéteres 1, 2, 3, 4 y 7 del estudio). Una vez finalizados los experimentos de recuperación se estudió la estructura de la membrana de los catéteres utilizados mediante microscopía electrónica de barrido (ver Material y Métodos). Además se estudiaron dos catéteres de 100 kDa nuevos (catéteres 5 y 6).

### PERFIL ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS DE 100 kDa

Para estudiar el perfil estructural de las membranas de alta resolución (*cut-off* de 100 kDa) se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de dos catéteres nuevos no usados previamente (catéter 5 y 6) y de los cuatro catéteres utilizados para los experimentos de recuperación relativa de las moléculas de estudio (catéteres 1, 2, 3 y 4).

La estructura de estos catéteres fue muy repetitiva, alterándose de forma exclusiva por artefactos de la técnica o por los métodos de sección utilizados para la preparación de las muestras. En la **Figura 25** se presenta una sección transversal del catéter de microdiálisis a unos 3-4 mm del extremo distal de la membrana. El extremo distal del catéter consta de la membrana dializante de 100 kDa (**A**) y de un tubo interno (**B**) que recoge el líquido de perfusión y lo lleva hacia el microvial de recogida.

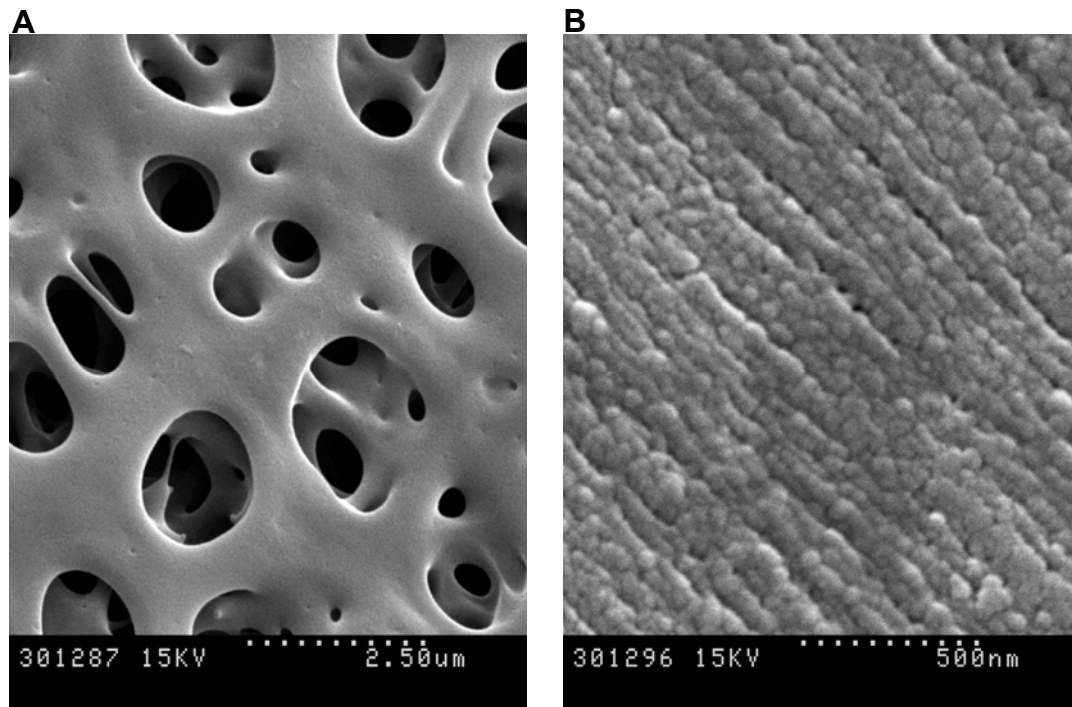


**Figura 25.** Imagen de una sección transversal de un catéter de 100 kDa. En esta fotografía se puede observar la membrana de 100 kDa (A) y el tubo interno (B). El lumen (C) del tubo interno está en este caso obstruido debido a un artefacto de la técnica.

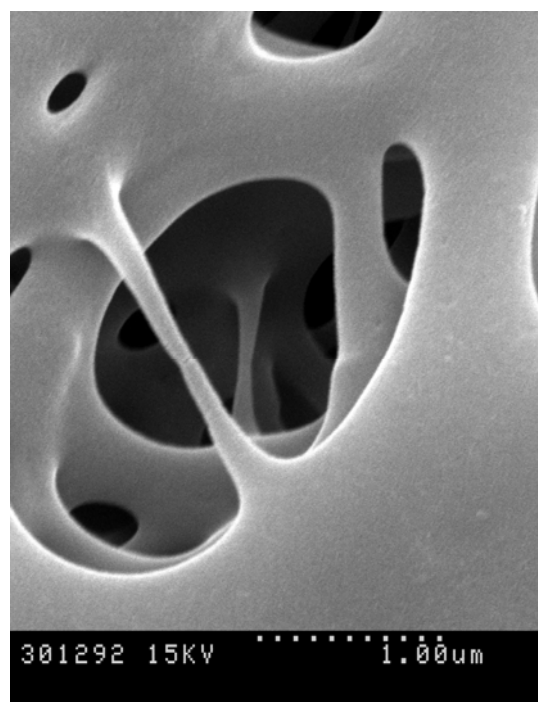
De los catéteres de 100 kDa nuevos se obtuvieron imágenes tanto de la cara externa como de la cara interna de la membrana de microdiálisis.

### **Características de la cara externa de la membrana**

Como se puede observar en la **Figura 26**, la cara externa de la membrana presenta unos poros de mayor tamaño que los que existen en su cara interna. Los poros de la membrana externa tienen en general una forma circular o elíptica y son de un tamaño fácilmente visibles por microscopía electrónica de barrido. En la **Figura 27** se puede observar con detalle un poro de la cara externa de la membrana donde se muestra la gran tortuosidad que presentan estos poros en su trayecto hasta la cara interna de la membrana dializante.

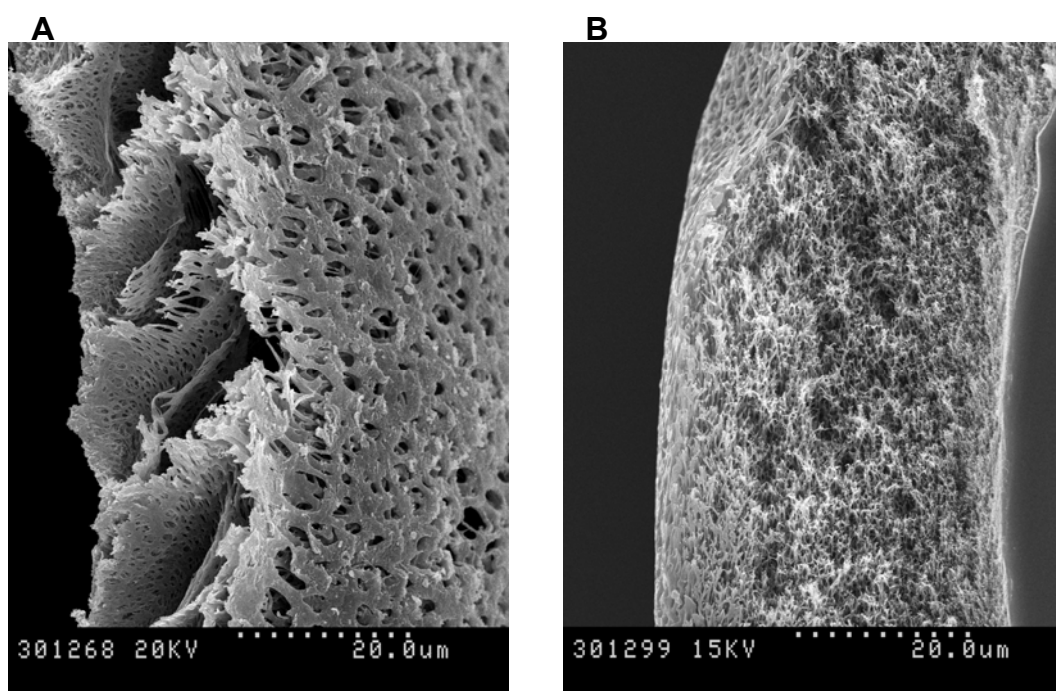


**Figura 26.** Fotografías de una membrana de microdiálisis cerebral de *cut-off* de 100kDa obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura A se muestra la cara externa de la membrana de microdiálisis y en la figura B, la cara interna.



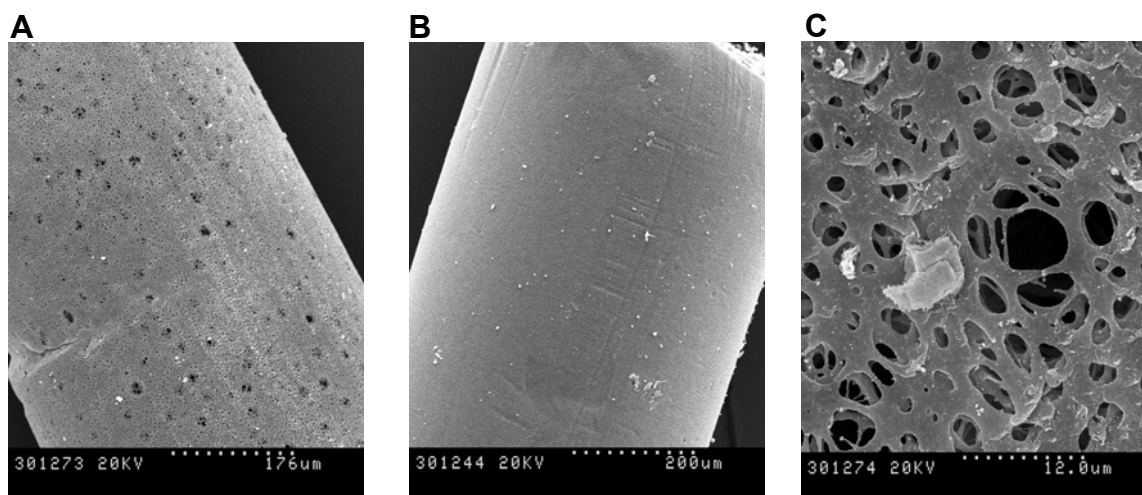
**Figura 27.** Detalle de uno de los poros de la cara externa de la membrana. En esta fotografía se puede observar la gran tortuosidad de los poros de la cara externa de la membrana de microdiálisis de 100 kDa. Imagen obtenida del catéter de 100 kDa nuevo.

Tal y como describen Helmy et al., (Helmy et al., 2009) en las mismas membranas de 100 kDa, la matriz porosa de la membrana de 100 kDa utilizada en el presente estudio consta de cavidades distribuidas a lo largo de todo el grosor de la matriz. Sin embargo, durante la observación de este tipo de membranas mediante microscopía electrónica de barrido se detectó la presencia de membranas con cavidades (**Figura 28a**) y de membranas sin dichas cavidades (**Figura 28b**). Estas cavidades estaban presentes en dos de los seis catéteres observados mediante microscopía electrónica de barrido (catéteres 1 y 2).



**Figura 28. Cortes transversales de dos membranas de 100 kDa.** En la imagen de la izquierda (A) se observa una membrana con cavidades (imagen obtenida de uno de los catéteres utilizados *in vitro* para la recuperación relativa de proteínas). En la imagen de la derecha (B) se observa una membrana de 100 kDa sin cavidades (imagen obtenida de un catéter de 100 kDa nuevo).

Otra de las características observadas fue la presencia de un subgrupo de poros más grandes en la cara externa de la membrana en algunos de los catéteres (**Figura 29a**). Estos poros no presentan tanta tortuosidad como el resto de los poros. Esta característica sólo se estudio en dos de los siete catéteres utilizados, de los cuales uno presentaba los grupos de poros de mayor tamaño (catéter 2) y el otro no (catéter 5). Estos grupos de poros más grandes siguen un patrón bastante regular a lo largo de toda la superficie de la cara externa con una densidad de 0,0003 grupos de poros/ $\mu\text{m}^2$ .



**Figura 29.** Imágenes de la superficie externa de la membrana de 100 kDa. A) Membrana de 100 kDa con los grupos de poros de mayor calibre repartidos por la superficie (imagen obtenida de uno de los catéteres utilizados *in vitro* par la recuperación relativa de las proteínas). B) Membrana de las mismas características sin estos grupos de poros (imagen obtenida del catéter de 100 kDa nuevo). C) Detalle de los grupos de poros de mayor tamaño y con menor tortuosidad.

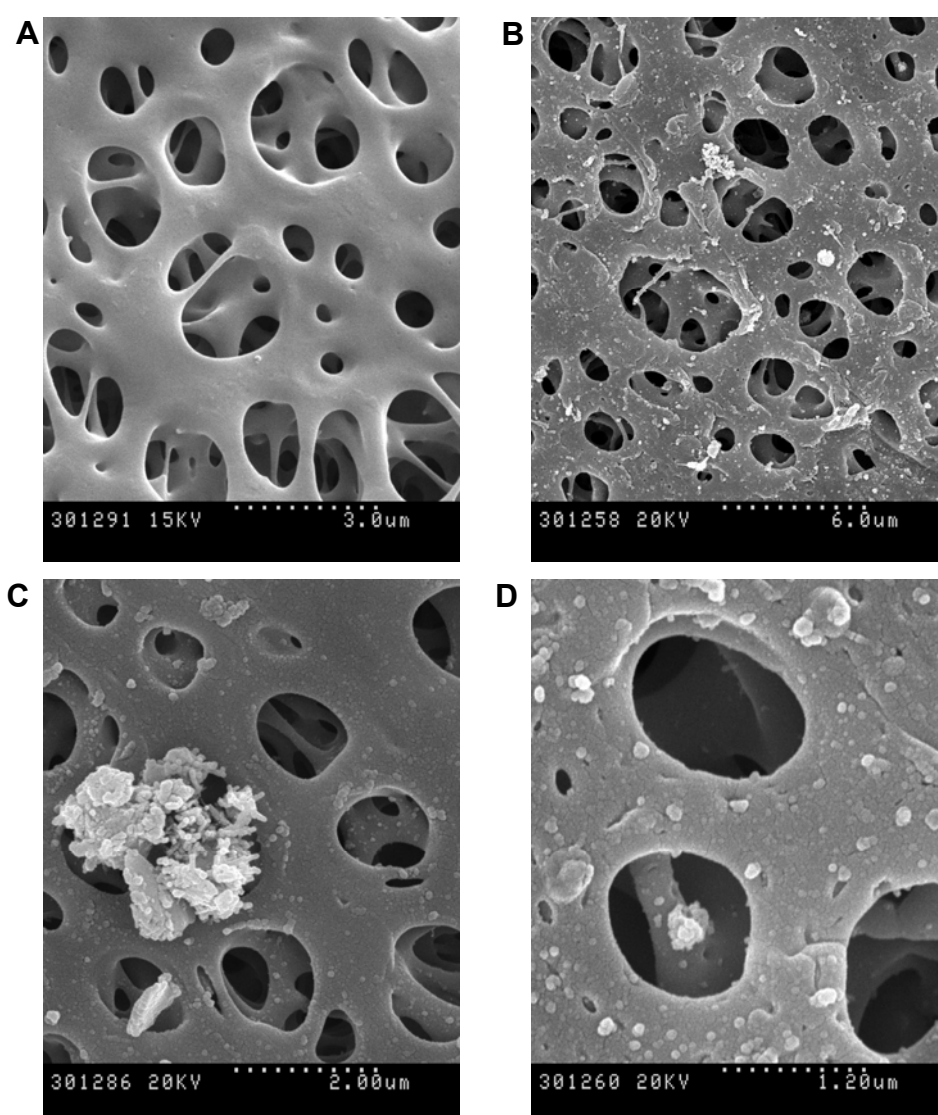
Para cuantificar el tamaño de la membrana y de los poros de la cara externa se realizaron varias medidas del grosor de la membrana dializante y del diámetro de los poros de la cara externa de la misma mediante el programa ImageJ 1.37v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). La media de los valores obtenidos del grosor de la membrana fue de  $30,33 \pm 1,02 \mu\text{m}$ . En relación a las áreas de los poros presentes en la cara externa de la membrana, la mediana de los valores obtenidos fue de  $0,48 \mu\text{m}^2$  (rango:  $0,03\text{-}4,46 \mu\text{m}^2$ ).

### Características de la cara interna de la membrana

Según la información facilitada por la casa comercial (CMA Microdialysis, Solna, Suecia), la cara interna de la membrana tiene unos poros de aproximadamente 10 nm, aunque con el microscopio electrónico utilizado para obtener las imágenes estos poros no se pudieron observar, ya que éste permitía una aproximación máxima de 500 nm (**Figura 26b**). Esto explica porqué a esta distancia fue imposible distinguir los poros de 10 nm que teóricamente se encuentran en la parte interna de la membrana.

### Fenómeno de *biofouling* producido en la cara externa de la membrana

Cuando se comparó la superficie de la membrana de 100 kDa entre el catéter sin utilizar (catéter 5) y los utilizados para la recuperación de las moléculas de estudio (catéteres 1, 2, 3 y 4) (**Figura 30**) se observó que en las membranas usadas para el experimento había partículas adheridas a la superficie y también en el interior de los poros que corresponderían, probablemente, a agregaciones de proteínas (**Figura 30**). Estos fenómenos son corrientes en las membranas que han estado en contacto con materia orgánica y se conocen como fenómenos de *biofouling*.



**Figura 30.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de membranas de 100 kDa. A) Imagen de la membrana de 100 kDa sin utilizar. B) Imagen de una de las membranas de 100 kDa utilizada para la recuperación *in vitro* de las moléculas de estudio. C y D) Detalles de las adherencias de material proteico en los poros de la cara externa de la membrana de 100 kDa utilizadas para los experimentos *in vitro*.

## EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA

Los resultados obtenidos en el experimento piloto (experimento descrito en la sección Material y Métodos) para determinar la distancia entre el microvial y la punta de la membrana a la cual el volumen infundido por la bomba (volumen esperado) era igual a la cantidad recuperada (volumen observado), se resumen en la **Tabla 10**.

En este experimento se observó que la distancia entre el microvial y la punta de la membrana que provocaba un menor error en la recuperación volumétrica oscilaba entre 45-48 mm (errores de -2,97% y de + 5,42 %, respectivamente). Aunque el error absoluto a 45 mm era menor que a 48 mm, se decidió colocar el microvial de recogida a 48 mm respecto a la punta del catéter de forma que el volumen recuperado nunca estuviese por debajo del volumen esperado (144  $\mu\text{L}$ ). De esta forma se asegura siempre un volumen suficiente para las determinaciones posteriores evitando pérdidas volumétricas desde el interior de la membrana hacia el medio.

**Tabla 10. Resultados de los experimentos preliminares de recuperación volumétrica**

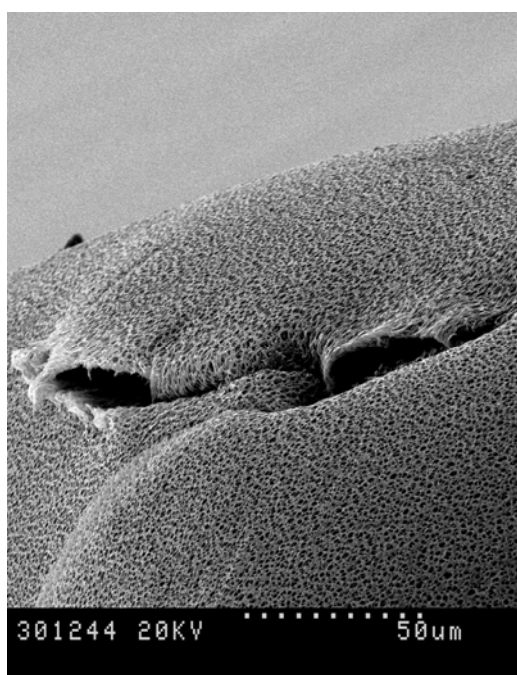
ALTURA (mm)	Nº HORAS	VOLUMEN ESPERADO ( $\mu\text{L}$ )	VOLUMEN OBSERVADO ( $\mu\text{L}$ )		ERROR (%)
			Mediana	Rango	
50	8	144	153,40	146,67- 181,87	+ 6,53
48	8	144	151,80	146,00- 160,00	+ 5,42
45	8	144	139,73	137,60- 152,00	- 2,97
40	8	144	128,00	124,67- 132,27	- 11,11

Como muestran los datos, el error mínimo se observó a las distancias entre 45 y 48 mm.

En un segundo experimento piloto, se perforó intencionadamente la membrana dializante utilizando un microscopio y una aguja de insulina (BD Micro-Fine™ 0,5 mL, 0,33 mm (29G) x 12,7 mm). El objetivo de este segundo experimento era comprobar si un posible desgarro de la membrana (**Figura 31**) de microdiálisis

durante la implantación del catéter *in vivo* podía afectar a la recuperación volumétrica y/o la RR de las moléculas. En este experimento se comprobó que en el catéter perforado intencionadamente no se producía ninguna recuperación volumétrica, es decir que el volumen recuperado en el microvial fue de 0  $\mu\text{L}$ . Esto indica que el líquido perfundido pasaba en su totalidad al medio.

Se observó que el líquido de perfusión se perdía desde el catéter hacia el exterior (hacia el tubo que contenía la solución problema) a través de uno de los cortes realizados previamente en la membrana (**Figura 31**). Esta pérdida de volumen se intentó solventar cambiando la distancia del microvial de recogida respecto a la punta de la membrana del catéter para contrarrestar las presiones hidrostáticas. Sin embargo, esta modificación en la altura no resolvió el problema de la pérdida volumétrica.



**Figura 31.** Detalle de uno de los cortes realizados a la membrana de 100 kDa. El desgarro en la membrana no permitió la recuperación de volumen.



## RECUPERACIÓN RELATIVA DE LAS CITOCINAS DE ESTUDIO

El sistema empleado para detectar las proteínas de estudio tanto en el medio como en el microdializado fue el sistema SearchLight™ (descrito en el apartado de Material y Métodos). Antes de realizar los cálculos correspondientes para determinar la recuperación relativa (RR) de cada citocina, los resultados obtenidos mediante el array proteómico Multiplex SearchLight™ *Human Custom* (Pierce Biotechnology Inc., Perbio, Rockford IL, EEUU) se procesaron con el objetivo de eliminar los valores no fiables. Con esta finalidad, las réplicas de una misma muestra que tenían un coeficiente de variación (CV) superior al 30% no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

### Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

La concentración de la IL-1 $\beta$  en la solución inicial en los catéteres 1, 2 y 3 fue de 32 pg/mL y en el catéter 4 de 94,12 pg/mL. En la **Tabla 11** se detallan los resultados obtenidos en las concentraciones de IL-1 $\beta$  en la solución inicial. Como se puede observar en la **Tabla 11**, para el catéter 2, la concentración de IL-1  $\beta$  en la solución inicial en los días 1, 2 y 3 fue aproximadamente la esperada (32 pg/mL), en cambio, en los días 4 y 5 la concentración fue menor a la esperada. Además, las concentraciones de estos 2 días fueron similares a las observadas en los 5 días del catéter 1, que tampoco se correspondían con la concentración esperada de esta proteína. Esto puede ser debido a que las muestras del catéter 1 y las muestras correspondientes a los días 4 y 5 del catéter 2 se analizaron con una placa de Multiplex SearchLight™ Array y las muestras correspondientes a los días 1, 2 y 3 del catéter 2 se analizaron con otra placa distinta. Los resultados sugieren que la placa utilizada para el catéter 1 y parte del catéter 2 era defectuosa, ya que las muestras se trataron por igual en los dos casos. Este mismo problema se dio para las cinco citocinas diana.

Tabla 11. Concentraciones de IL-1 $\beta$  detectadas en la solución inicial (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	8,80	8,80-8,80	6,10	5,70-6,40	7,10	6,00-8,20	7,00	7,00-7,00	6,95	5,80-8,30	7,00	6,10-8,80
<b>Catéter 2</b>	29,30	27,30-31,30	25,50	21,30-32,60	27,80	26,20-31,50	7,50	6,50-28,00	7,75	6,40-8,20	25,50	7,50-29,30
<b>Catéter 3</b>	11,10	8,00-14,20	0,40	0,40-0,40	ND	ND	ND	ND	10,10	10,10-10,10	10,10	0,40-11,10
<b>Catéter 4</b>	72,90	54,60-104,30	110,60	99,60-111,70	108,70	98,70-108,70	115,50	113,80-115,60	106,70	101,90-116,90	108,70	72,90-115,50

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Tabla 12. Concentración de IL-1 $\beta$  en el recuperado.

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	8,2	5,10-11,30	4,80	4,60-9,80	8,25	7,90-8,60	8,40	7,80-10,40	7,90	7,30-9,90	8,20	4,80-8,40
<b>Catéter 2</b>	16,10	10,40-18,10	9,90	6,40-13,40	8,90	6,00-9,50	11,30	8,80-14,60	16,50	15,20-18,10	11,30	8,90-16,50
<b>Catéter 3</b>	0,70	0,30-1,10	0,20	0,20-0,40	0,20	0,20-0,30	0,20	0,20-0,30	0,25	0,20-0,30	0,20	0,20-0,70
<b>Catéter 4</b>	1,30	0,80-1,80	1,60	0,90-2,30	1,30	1,20-1,40	0,85	0,80-0,90	0,35	0,10-0,60	1,30	0,35-1,60

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo)

En el catéter 3, la concentración de IL-1 $\beta$  de la solución inicial tampoco fue la esperada (32 pg/mL). Esto pudo ser debido a que las muestras obtenidas de este catéter se almacenaron a 4°C en vez de a -80°C, lo que pudo ocasionar una degradación de las proteínas. Debido a esta incidencia, sólo fue posible detectar las concentraciones de la solución inicial para los días 1, 2 y 5. En el caso del catéter 4, las concentraciones de la solución inicial de los cinco días se corresponden aproximadamente a la esperada (94,12 pg/mL). En la **Tabla 12** se muestran las concentraciones de IL-1 $\beta$  obtenidas en los dializados de los cuatro catéteres.

La mediana de la RR del catéter 1 de los 5 días fue de 113,67%. Sin embargo, al considerar erróneos los valores obtenidos de la concentración de la solución inicial (mucho más baja que los 32 pg/mL esperados), no se puede considerar que esta RR tan elevada sea real. En el caso del catéter 2, como las concentraciones esperadas de la solución inicial sólo eran correctas en los días 1, 2 y 3, las RR obtenidas los días 4 y 5 no pueden ser consideradas válidas.

Los porcentajes de RR del catéter 3 no fueron tampoco fiables si tenemos en cuenta que la concentración determinada en las muestras de la solución inicial no era la esperada. Una de las hipótesis es que las muestras pudieron sufrir un proceso de degradación al ser almacenadas a 4°C en vez de a -80°C. Por lo tanto, la RR de la IL-1 $\beta$  se consideró válida sólo en el caso del catéter 2 (días 1, 2 y 3) y del catéter 4 (días 1-5). En la **Tabla 13** se observa que entre estos dos catéteres existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la RR de esta proteína (Prueba de Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

**Tabla 13. Recuperación Relativa de IL-1 $\beta$  (%)**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	M	R	Z*	P
<b>Catéter 1</b>	93,18	78,69	116,20	120	113,67	113,67	78,69- 120	-2,236	0,036
<b>Catéter 2</b>	54,95	38,82	32,01	150,67	212,90	54,95	32,01- 212,90		
<b>Catéter 3</b>	6,31	50,00	ND	ND	2,48	6,31	2,48- 50		
<b>Catéter 4</b>	1,78	1,44	1,20	0,74	0,33	1,32	0,74- 1,78		

Porcentajes de recuperación relativa de la IL-1 $\beta$  de los cuatro catéteres y comparación de la RR de la IL-1 $\beta$  entre los catéteres 2 y 4. \*Prueba de Mann-Whitney que determina que existen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre la RR de los dos catéteres. ND: Datos no obtenidos

### Interleucina-6 (IL-6)

La concentración de la IL-6 preparada en la solución inicial para los catéteres 1, 2 y 3 fue de 32 pg/mL y para el catéter 4 de 99,76 pg/mL. Al igual que en el caso de la IL-1 $\beta$ , las concentraciones de la solución inicial del catéter 1, del catéter 2 (días 4 y 5) y del catéter 3 no se consideraron fiables. Como se observa en la **Tabla 14**, los valores de la concentración de IL-6 en la solución inicial del catéter 2 (días 1, 2 y 3) y del catéter 4 fueron los esperados.

La concentración de la IL-6 en el microdializado (**Tabla 15**) de los catéteres 3 y 4 no se detectó mediante la técnica SearchLight ya que los niveles de la proteína eran muy bajos y estaban por debajo del rango de detección (*unders*), por lo que no se pudo calcular la RR de la IL-6 para estos catéteres (**Tabla 16**). Por lo tanto, las únicas RR consideradas válidas para esta proteína fueron las calculadas para los días 1, 2 y 3 del catéter 2 (**Tabla 16**).

Tabla 14. Concentraciones de IL-6 detectadas en la solución inicial (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	4,4	4,4- 4,4	3,3	3,10- 3,80	4,20	3,00- 5,30	3,75	3,60- 3,90	3,90	3,30- 4,70	3,90	3,30- 4,40
<b>Catéter 2</b>	18,65	17,60- 19,70	21,50	18,80- 26,80	23,60	22,40- 24,20	4,10	3,30- 25,40	4,20	3,70- 4,50	18,65	4,10- 23,60
<b>Catéter 3</b>	4,35	3,10- 5,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,3	3,3- 3,3	3,83	3,30- 4,35
<b>Catéter 4</b>	69,90	47,90- 109,00	102,50	96,70- 105,90	94,10	91,50- 109,60	109,60	104,40- 114,50	107,70	106,00- 115,20	102,50	69,90- 109,60

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Tabla 15. Concentración de IL-6 en el microdializado (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	2,40	1,40-3,40	1,60	0,10-3,40	2,40	1,80-2,70	2,50	2,10-2,50	2,20	0,70-2,40	2,40	1,60-2,50
<b>Catéter 2</b>	2,20	1,30-3,70	2,05	1,40-2,70	1,70	0,80-2,00	4,60	1,60-7,50	4,50	3,90-6,10	2,20	1,70-4,60
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

**Tabla 16. Recuperación Relativa de IL-6 (%)**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Total	
						Mediana	Rango
<b>Catéter 1</b>	54,55	48,48	57,14	66,67	56,41	56,41	48,48-66,67
<b>Catéter 2</b>	11,80	9,53	7,20	112,20	107,14	11,80	7,20-112,20
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La RR de los catéteres 3 y 4 no se pudo calcular ya que no se detectó la concentración de la proteína en el microdializado. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

### Interleucina-8 (IL-8)

La concentración de la IL-8 en la solución inicial en los catéteres 1, 2 y 3 fue de 64 pg/mL y en el catéter 4 de 199,53 pg/mL. Estas concentraciones sólo se detectaron en el caso del catéter 2 (días 1, 2 y 3) y del catéter 4 (**Tabla 17**), debido a los problemas ya mencionados con los otros catéteres en apartados anteriores.

Los resultados de la concentración de la solución inicial de los catéteres 1 y 3 no se consideraron válidos debido a que diferían demasiado de la concentración esperada de 64 pg/mL.

Los valores de IL-8 para el microdializado del catéter 3 (**Tabla 18**) aparecen como *unders* debido a que los niveles de esta interleucina en el líquido recuperado estaban por debajo del límite de detección de la técnica. Esto podría deberse a que las muestras fueron almacenadas a 4°C en vez de a -80°C. Es por este motivo que para este catéter no pudimos calcular la RR de la proteína (**Tabla 19**).

Tabla 17. Concentración de IL-8 en la solución inicial (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	3,9	3,9- 3,9	2,50	1,70- 2,70	2,95	2,70- 3,20	3,00	2,90- 3,10	3,45	2,40- 3,90	3,00	2,50- 3,90
<b>Catéter 2</b>	48,60	14,70- 54,60	61,40	57,80- 71,10	62,20	58,60- 63,60	26,30	3,60- 73,30	3,50	2,60- 4,00	48,60	3,50- 62,20
<b>Catéter 3</b>	2,60	2,60- 2,60	3,70	3,70- 3,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,15	2,60- 3,70
<b>Catéter 4</b>	134,60	117,70- 211,70	191,70	186,20- 225,70	183,40	176,00- 205,60	206,90	178,10- 220,60	215,20	192,90- 217,90	191,70	134,60- 215,20

En el caso del catéter 1, 2 (días 4 y 5) y 3 las concentraciones detectadas eran mucho más bajas que las esperadas. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Tabla 18. Concentración de IL-8 en el microdializado (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	17,65	9,60-25,70	11,00	3,80-25,90	21,05	17,00-25,10	19,00	14,70-23,30	19,50	16,60- 25,10	19,00	11,00-21,05
<b>Catéter 2</b>	26,20	23,90-28,50	19,30	15,10-23,50	15,40	13,00-18,80	28,10	22,20-34,00	35,80	34,60- 40,60	26,20	15,40-35,80
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	0,40	0,10-0,70	6,25	3,40-9,10	11,20	7,60-14,80	7,05	5,50-8,60	1,10	0,20-2,00	6,25	0,40-11,20

En el caso del catéter 3 la IL-8 no se detectó en ninguno de los días. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Teniendo en cuenta que las concentraciones del medio de la IL-8 en el catéter 1 fueron mucho más bajas que las esperadas (64 pg/mL), las RR obtenidas no se consideraron válidas. En la **Tabla 19** se muestran los resultados de la comparación de las RR entre los catéteres 2 y 4. La prueba de Mann-Withney muestra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre la RR de ambos catéteres.

**Tabla 19. Recuperación Relativa de IL-8 (%)**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Mediana	Rango	Z**	P
<b>Catéter 1</b>	452,56	440,00	713,56	633,33	565,22	565,22	440,00- 713,56	-2,236	0,036
<b>Catéter 2</b>	53,90	31,43	24,76	106,84	1022,86*	42,67	24,76- 106,84		
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
<b>Catéter 4</b>	0,30	3,26	6,11	3,41	0,51	3,26	0,30- 6,11		

Cálculo de las RR de IL-8 y comparación de la RR entre el catéter 2 y 4. La RR del catéter 3 no se pudo calcular debido a que la concentración de la interleucina en el microdializado era indetectable. \* La RR del día 5 del catéter 2 no se consideró válida ya que la concentración de la solución inicial era muy baja, el valor no se incluyó en el cálculo de la mediana. \*\*Prueba de Mann-Withney que muestra diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre la RR de los dos catéteres. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

### Interleucina-10 (IL-10)

La concentración de IL-10 en la solución inicial de los catéteres 1, 2 y 3 fue de 64 pg/mL y en el catéter 4 de 263,53 pg/mL. La **Tabla 20** muestra los resultados de la concentración de IL-10 en la solución inicial de los cuatro catéteres. En el caso del catéter 1 la concentración de la solución inicial fue de 0,1-0,2 pg/mL, una concentración mucho más baja a la esperada (64 pg/mL). La concentración en el microdializado se determinó como *unders* y por este motivo no se pudo determinar la RR de esta citocina en este catéter.



Tabla 20. Concentración de IL-10 en la solución inicial (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 2</b>	2,45	2,30-2,60	4,80	4,40-6,70	5,70	4,10-6,50	0,35	0,20-9,40	0,20	0,10-0,30	2,45	0,20-5,70
<b>Catéter 3</b>	0,20	0,10-0,30	ND	ND	0,10	0,10-0,10	0,10	0,10-0,10	0,10	0,10-0,10	0,20	0,10-0,30
<b>Catéter 4</b>	27,20	22,90-30,50	44,10	27,30-70,00	39,80	32,30-60,90	41,30	36,70-64,80	39,60	34,70-62,90	39,80	27,20-44,10

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Tabla 21. Concentración de IL-10 en el microdializado (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,10	0,10-0,70	0,30	0,20-0,30	0,20	0,10-0,30
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Debido a que casi en ningún caso se detectaron niveles de IL-10 en el microdializado no se pudo calcular la RR de esta molécula. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

En el caso del catéter 2 la parte de las muestras que se determinaron con la placa supuestamente defectuosa (días 4 y 5) tenían unas concentraciones de IL-10 en la solución inicial más bajas que la parte de las muestras determinadas con la placa correcta (días 1, 2 y 3). Aún así, la concentración seguía siendo menor a la esperada (64 pg/mL).

Las muestras de la solución inicial y los microdializados obtenidos a partir del catéter 3 se almacenaron a 4°C. Debido a que se obtuvieron resultados muy bajos en las concentraciones de esta interleucina en la solución inicial y en los microdializados (las medidas fueron *unders*) en este caso tampoco fue posible determinar las RR para esta molécula. Lo más probable es que en estas condiciones de almacenamiento la IL-10 se hubiese degradado.

En el catéter 4 decidimos aumentar las concentraciones de las citocinas en la solución inicial para así poder detectarlas en el caso que se degradasen. A diferencia de los otros catéteres, en este caso, la IL-10 se detectó en la solución inicial pero aún así la concentración determinada seguía siendo menor a la esperada (263,53 pg/mL).

La concentración de IL-10 en el microdializado de los cuatro catéteres (**Tabla 21**) no fue detectada (*unders*) excepto para los días 4 y 5 del catéter 2 aunque en este caso la concentración detectada seguía siendo muy baja. Por ello, la RR de la IL-10 no pudo ser determinada para ninguno de los catéteres. Debido a que para el catéter 2 las concentraciones de la solución inicial no fueron las esperadas se consideró oportuno descartar del análisis las RR de los días 4 y 5 para este catéter.

### **Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

La concentración del TNF- $\alpha$  preparada en la solución inicial para los catéteres 1, 2 y 3 fue de 384 pg/mL y en el catéter 4 de 1219,76 pg/mL. El TNF- $\alpha$  dio el mismo problema que la IL-10. Esta citocina se degradó incluso almacenando las muestras a -80°C. Por este motivo no pudimos calcular la RR en ninguno de los cuatro catéteres.

La concentración del TNF- $\alpha$  en la solución inicial sólo se pudo determinar en el catéter 4 (**Tabla 22**), aun así la concentración fue también mucho más baja que la esperada (1219,76 pg/mL) y en este caso la RR tampoco se pudo calcular ya que los valores del TNF- $\alpha$  en el microdializado se estimaron por debajo del límite de detección del método (**Tabla 23**). Las concentraciones de TNF- $\alpha$  detectadas en la solución inicial del catéter 2 se consideraron inválidas debido a que los niveles obtenidos eran mucho más bajos respecto a la concentración preparada (384 pg/mL).

Tabla 22. Concentración de TNF- $\alpha$  en la solución inicial (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 2</b>	0,50	0,50-0,50	0,80	0,50-0,80	0,60	0,60-0,70	0,60	0,30-1,10	0,45	0,40-0,50	0,60	0,45-0,80
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	21,80	18,30-79,10	28,70	19,10-218,10	29,80	23,00-242,70	31,60	25,60-205,00	25,20	22,20-186,00	28,70	21,80-31,60

El TNF-  $\alpha$  se degradó incluso almacenando las muestras a -80°C. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

Tabla 23. Concentración de TNF- $\alpha$  en el microdializado (pg/mL)

	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Catéter 1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,60	0,20-0,90	ND	ND
<b>Catéter 3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Catéter 4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Sólo se detectaron niveles de TNF- $\alpha$  en el día 5 del catéter 2. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo) ND: Datos no obtenidos

### Degradación de las proteínas de estudio

Debido a los problemas observados en relación a la degradación de ciertas proteínas (IL-10 y TNF- $\alpha$ ), incluso a pesar de ser almacenadas a -80°C, se analizó la degradación de cada una de ellas respecto a la concentración añadida a la solución inicial del experimento de recuperación. En la **Tabla 24** se muestra qué concentración de cada citocina estaba presente en la solución inicial después de ser almacenada a -80°C y una vez iniciado el experimento a 37°C respecto a la que se añadió al preparar la solución. Los valores corresponden a la solución del catéter 4, ya que es la que se preparó con mayor concentración de cada proteína y los niveles fueron detectados en todos los casos. En esta tabla (**Tabla 24**) se puede observar que las proteínas que mejor se conservan a -80°C son la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, a diferencia de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  que presentan una gran degradación incluso cuando se almacenan a -80°C durante cortos períodos de tiempo.

**Tabla 24.** Concentraciones detectadas de las citocinas respecto a las concentraciones añadidas en la solución inicial del catéter 4

Citocina	Concentración añadida a la solución inicial (pg/mL)	Concentraciones detectadas en la solución inicial (pg/mL)						$\chi^2$ *	P
		0 horas		12 horas		24 horas			
		M	R	M	R	M	R		
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	94,12	108,70	54,60-115,60	101,90	72,90-113,80	108,70	99,60-116,90	2,842	0,241
<b>IL-6</b>	99,76	102,50	47,90-106,00	105,90	69,90-109,60	109,60	96,70-115,20	3,600	0,165
<b>IL-8</b>	199,53	206,90	117,70-225,70	191,70	134,60-220,60	192,90	178,10-211,70	0,400	0,819
<b>IL-10</b>	263,53	62,90	30,50-70,00	39,80	22,90-44,10	32,30	27,20-36,70	8,400	0,015
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1219,76	205,00	79,10-242,70	28,70	18,30-31,60	22,20	19,10-25,60	8,400	0,015

No existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en las 0, 12 y 24 horas, en cambio estas diferencias si que existen en el caso de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  (P<0,05). \*Prueba de Friedman. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo)

Otro aspecto destacable, es que los niveles de IL-10 y TNF- $\alpha$  variaron cuando la muestra pasó de estar almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  a almacenarse a  $37^{\circ}\text{C}$ . En cambio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de estas citocinas después de estar 12 y 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  (**Tabla 25**).

**Tabla 25.** Comparación de los niveles de IL-10 y TNF- $\alpha$  a las 0, 12 y 24 horas del experimento

Citocinas	Variables comparadas	Z*	P
IL-10	H0-H12	-2,023	0,043
	H0-H24	-2,023	0,043
	H12-H24	-1,753	0,080
TNF- $\alpha$	H0-H12	-2,023	0,043
	H0-H24	-2,023	0,043
	H12-H24	-1,483	0,138

Las diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de IL-10 y TNF- $\alpha$  en la solución inicial se observaron al comparar los niveles de estas proteínas a las 0 horas con las 12 y 24 horas del experimento. \*Test de Wilcoxon. H0: 0 horas, inicio experimento; H12: 12 horas; H24: 24 horas

## DETERMINACIÓN DE LA ALBÚMINA

La concentración de albúmina se determinó en tres de los cinco catéteres (catéteres 1, 3 y 7). Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla 26**. En el catéter 1 se realizaron tres valoraciones de la concentración de albúmina en la solución inicial y valoraciones de la albúmina de los microviales recuperados a las 8, 16 y 24 horas de cada uno de los 5 días que duró el experimento. Para los cálculos se consideró la mediana de las tres réplicas de la solución inicial y la mediana de todas las valoraciones de la albúmina en los microdializados. La RR de la albúmina se calculó utilizando estas dos medianas.

En el catéter 3 se obtuvieron seis determinaciones de la concentración de albúmina de la solución inicial. Además de las valoraciones de los microdializados y en el catéter 7 se obtuvieron ocho determinaciones de la solución inicial y ocho del microdializado. El cálculo de la RR se realizó de la misma forma que para el catéter 1.

Tabla 26. Concentración y RR de la albúmina sérica humana.

CATÉTER	CONCENTRACIÓN EN LA SOLUCIÓN INICIAL		CONCENTRACIÓN EN EL MICRODIALIZADO		RR (%)
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
CATÉTER 1	199,1	194,4 – 204,8	5,55	1,00 – 14,90	2,79
CATÉTER 3	207,0	206,1 – 211,1	0,30	0,20 – 1,20	0,14
CATÉTER 7	961,70	940,50-1025,20	0,50	0,40-2,00	0,05
TOTAL				Mediana	0,14
				Rango	0,05-2,79

Los resultados de los catéteres 1, 3 y 7 se expresan como medianas y rangos. La concentración inicial de albúmina en los catéteres 1 y 3 era de 200 mg/L y en el catéter 7 de 1000 mg/L.

El rango de detección del analizador inmunoquímico OLYMPUS® AU5400™ Chemistry-Immuno Analyzer (Olympus America Inc., Diagnostic Systems Group, Melville, New York) con el que se realizaron las determinaciones es de 5-300 mg/L. Por lo tanto, la concentración de albúmina de la solución inicial de los catéteres 1 y 3 (200 mg/L) estaba dentro del rango de detección. En cambio, se observa que algunas de las concentraciones obtenidas del microdializado y de la solución inicial del catéter 7 (1000 mg/L) no estuvieron dentro del rango de detección del analizador. Aun así, si una determinación está fuera de rango el analizador realiza diluciones de la muestra y calcula el resultado correspondiente en función de las diluciones realizadas.

La mediana de la RR obtenida para la albúmina sérica humana utilizando membranas de *cut-off* de 100 kDa fue de 0,14 % (rango: 0,05-2,79%).

## DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

Los niveles de los metabolitos (glucosa, lactato, piruvato y glicerol) fueron determinados en dos de los cinco catéteres utilizados para la recuperación relativa de las moléculas (catéteres 1 y 2). Durante los 5 días que duró el experimento, los microviales se cambiaron cada 8 horas, obteniendo así tres medidas por día de los niveles de cada metabolito. Las concentraciones de glucosa, lactato, piruvato y glicerol añadidas a la solución inicial fueron de 2,6 mM, 1,18 mM, 117,65 µM y 223,53 µM, respectivamente. Las concentraciones de los metabolitos en la solución

inicial de los catéteres 1 y 2 fueron similares a las preparadas excepto para el caso del glicerol en que la concentración detectada fue moderadamente superior (**Tabla 27 y 29**). Las **Tablas 28 y 30** resumen las concentraciones de los metabolitos detectadas en los microdializados del catéter 1 y 2.

Para realizar los cálculos de la RR de los metabolitos (**Tabla 31**), se eliminaron seis lecturas del catéter 1 y tres del catéter 2, ya que fueron consideradas fuera de rango de detección (*outliers*). En la misma **Tabla 31** se refleja la comparación de las RR de los metabolitos entre los catéteres 1 y 2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la RR para ninguno de los metabolitos para los dos catéteres. Debido a estos resultados, las RR diarias de cada catéter se unieron y se calculó la RR total para cada metabolito.

Según los rangos de detección proporcionados por el analizador CMA600 (CMA Microdialysis, Solna, Suecia) especificados en el apartado de metodología, las concentraciones de metabolitos añadidos en la solución inicial se encontraron siempre dentro de sus respectivos rangos.



Tabla 27. Concentración de los metabolitos en la solución inicial del catéter 1

Metabolito	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		TOTAL	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Glucosa (mM)</b>	2,81	2,44- 3,44	2,80	2,56- 3,72	2,38	1,42- 3,12	2,72	1,99- 3,42	2,76	1,97- 3,55	2,76	2,38- 2,81
<b>Lactato (mM)</b>	1,15	0,92- 1,52	1,62	1,15- 3,11	1,30	1,23- 1,36	1,34	1,07- 1,42	1,22	1,04- 1,50	1,30	1,15- 1,62
<b>Piruvato (µM)</b>	85,49	68,43- 115,38	120,25	82,17- 240,44	92,37	53,87- 94,28	94,04	73,98- 98,18	86,83	71,94- 107,26	92,37	85,49- 120,25
<b>Glicerol (µM)</b>	418,69	314,57- 473,29	587,26	385,35- 1174,28	434,00	386,99- 484,21	542,35	267,65- 670,91	501,5 0	385,65- 555,07	501,50	418,69- 587,26

En el caso del glicerol la concentración detectada fue mayor que la que se añadió al preparar la solución inicial. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo)

Tabla 28. Concentraciones de los metabolitos en el microdializado del catéter 1

Metabolito	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		TOTAL	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Glucosa (mM)</b>	2,10	1,64- 2,56	1,69	1,67- 3,13	2,63	1,69- 3,07	3,30	2,87- 3,55	5,16	2,77- 6,97	2,63	1,69- 5,16
<b>Lactato (mM)</b>	2,10	1,31- 2,88	0,66	0,56- 1,36	1,04	0,87- 1,20	1,40	1,24- 1,41	2,53	1,41- 3,85	1,40	0,66- 2,53
<b>Piruvato (μM)</b>	95,26	36,69- 97,65	38,26	34,22- 101,64	68,98	40,53- 77,86	85,91	47,08- 106,50	241,83	188,95- 294,72	85,91	38,26- 241,83
<b>Glicerol (μM)</b>	322,74	195,33- 450,14	197,77	138,81- 470,02	317,11	194,76- 400,76	596,71	541,66- 651,76	1018,77	473,45- 1553,07	322,74	197,77- 1018,77

M: mediana R: Rango (mínimo-máximo)

Tabla 29. Concentraciones de los metabolitos en la solución inicial del catéter 2.

Metabolito	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		TOTAL	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Glucosa (mM)</b>	2,83	2,68-	3,19	1,86-	1,87	1,39-	3,59	2,28-	3,12	0,32-	3,12	1,87-
		3,12		3,39		4,60		3,90		3,30		3,59
<b>Lactato (mM)</b>	1,32	1,10-	1,29	1,18-	1,73	1,42-	1,50	1,14-	1,20	1,05-	1,32	1,20-
		1,61		1,40		2,07		1,63		1,29		1,73
<b>Piruvato (µM)</b>	84,26	75,77-	92,96	67,50-	121,25	44,33-	105,94	77,03-	83,59	74,02-	92,96	83,59-
		110,16		104,29		148,52		117,77		89,21		121,25
<b>Glicerol (µM)</b>	467,49	401,54-	344,01	175,87-	579,41	509,86-	722,02	605,42-	526,08	496,23-	526,08	344,01-
		584,08		407,01		719,42		839,03		604,18		722,02

En el caso del glicerol la concentración detectada fue mayor que la esperada (223,53 µM) M: mediana R: Rango (mínimo-máximo)

Tabla 30. Concentraciones de los metabolitos en el microdializado del catéter 2

Metabolito	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		TOTAL	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
<b>Glucosa (mM)</b>	1,59	0,91- 2,09	1,22	0,93- 1,51	1,30*	1,30- 1,30	1,16*	1,16- 1,16	2,56	2,45- 2,89	1,30	1,16- 2,56
<b>Lactato (mM)</b>	1,03	0,14- 1,28	1,60*	1,60- 1,60	0,46*	0,46- 0,46	0,31*	0,31- 0,31	1,11	1,03- 1,11	1,03	0,31- 1,60
<b>Piruvato (µM)</b>	79,71	28,12- 96,97	40,71	9,62- 71,80	33,22	29,29- 37,15	11,24	9,38- 13,10	77,67	66,73- 79,61	40,71	11,24- 79,71
<b>Glicerol (µM)</b>	402,84	374,19- 488,76	287,90	170,84- 404,95	290,19	225,22- 355,15	295,01	124,24- 465,78	465,56	307,52- 537,90	295,01	287,90- 465,56

\* Por falta de volumen, la determinación de glucosa para los días 3 y 4 y la determinación del lactato en los días 2, 3 y 4 sólo se realizó con un microvial. M: mediana R: Rango (mínimo-máximo).

Tabla 31. Recuperación relativa de los metabolitos (%)

Metabolito	C	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Mediana	Rango	Z*	P
Glucosa	1	74,73	60,36	110,50	121,32	186,96	110,50	60,36-186,96	-1,984	0,056
	2	56,18	38,24	69,52	32,31	82,05	56,18	32,31-82,05		
<b>TOTAL</b>							<b>72,13</b>	<b>32,31-186,96</b>		
Lactato	1	182,61	40,74	80,00	104,48	207,38	104,48	40,74-207,38	-1,358	0,222
	2	78,03	124,03	26,59	20,67	92,50	78,03	20,67-124,03		
<b>TOTAL</b>							<b>86,25</b>	<b>20,67-207,38</b>		
Piruvato	1	111,43	31,82	74,68	91,35	278,52	91,35	31,82-278,52	-1,149	0,310
	2	94,60	43,79	27,40	10,61	92,92	43,79	10,61-94,60		
<b>TOTAL</b>							<b>83,02</b>	<b>10,61-278,52</b>		
Glicerol	1	77,08	33,68	73,07	110,02	203,14	77,08	33,68-203,14	-0,313	0,841
	2	86,17	83,69	50,08	40,86	88,50	83,69	40,86-88,50		
<b>TOTAL</b>							<b>80,39</b>	<b>33,68-203,14</b>		

En los cuatro casos el test demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en cuanto a la RR de los metabolitos entre los dos catéteres. \*Prueba de Mann-Whitney. C: Catéter

## DISCUSIÓN

---

Cuando se produce un TCE se generan dos tipos de lesiones: las lesiones cerebrales primarias, que se producen en el momento del impacto, y las lesiones cerebrales secundarias, generadas minutos, horas y días después del TCE. Las lesiones secundarias desencadenan una cascada de procesos bioquímicos entre los que se encuentran la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios. Estos mediadores, a su vez, provocan edema cerebral y un incremento de la presión intracraneal. Estos fenómenos pueden provocar un empeoramiento clínico del paciente. Es por este motivo que el interés por el estudio de estos mediadores inflamatorios se ha incrementado en los últimos años.

La técnica de la microdiálisis cerebral permite el muestreo continuo del contenido del líquido intersticial cerebral y por lo tanto, permite conocer los niveles de los metabolitos y de las macromoléculas presentes en este líquido. Actualmente, la técnica de la microdiálisis ya se ha implantado en muchas Unidades de Cuidados Intensivos para la recuperación de metabolitos como la glucosa, el lactato, el piruvato y el glicerol que permiten conocer el metabolismo cerebral a tiempo casi real. El interés por la recuperación de macromoléculas tales como las citocinas, ha facilitado el desarrollo de catéteres de microdiálisis cerebral con membranas de *cut-off* mayor (100 kDa). Este tipo de membranas permite el paso de metabolitos y además de moléculas de mayor PM como son las citocinas. Aun así, numerosos estudios han observado que la recuperación de las macromoléculas es variable y no es igual de homogénea que en el caso de los metabolitos ya que en su recuperación influyen factores intrínsecos a las propias membranas de microdiálisis pero también factores de las propias moléculas de interés. Por este motivo, es de vital importancia la calibración del sistema de microdiálisis, es decir, determinar el porcentaje de recuperación relativa (RR) *in vitro* para cada una de las moléculas de interés y de esta forma extrapolar los resultados de esta RR a futuros estudios *in vivo*. Además, es también importante realizar un estudio detallado de la estructura de este tipo de membranas de alta resolución para entender mejor los problemas que generan en la recuperación de las macromoléculas.

## ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA DE 100 kDa

### Tamaño y forma de los poros

Existen dos tipos de poros en la membrana de microdiálisis: los de la cara externa y los de la cara interna. Los poros observados en la cara externa de la membrana tienen una forma entre circular y elíptica y son de mucho mayor tamaño que los poros de la cara interna, que son, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial (CMA Microdialysis, Solna, Suecia), de aproximadamente 10 nm de diámetro medio. Por lo tanto, el *cut-off* de los catéteres viene determinado realmente por los poros de la cara interna ya que es el punto de mayor resistencia a la difusión de las macromoléculas. Aun así, la tortuosidad de los poros externos, que se distribuyen a lo largo de toda la matriz (espacio poroso que hay entre la cara externa y la cara interna de la membrana), también puede dificultar el paso de las moléculas a través de los mismos.

### Cara externa de la membrana

Como se ha comentado en el apartado anterior, los poros presentes en la cara externa de la membrana son de forma circular o elíptica. Estos poros están repartidos de forma más o menos homogénea a lo largo de toda la superficie de la cara externa de la membrana. La mediana de los valores obtenidos del área de estos poros fue de  $0,48 \mu\text{m}^2$  (rango:  $0,03\text{-}4,46 \mu\text{m}^2$ ). Aun así, en alguno de los catéteres utilizados en el estudio se observaron agrupaciones de poros de mayor tamaño y menor tortuosidad. Estos subgrupos de poros se podrían haber generado durante la fabricación de las membranas. No obstante, no hemos encontrado ninguna razón específica para la formación de estos grupos de poros con menor tortuosidad. Tampoco se pudo asociar a una mayor o menor RR de las citocinas de estudio ya que este fenómeno sólo se describió en uno de los catéteres utilizados para los experimentos de recuperación y siempre en la cara externa de la membrana.

### **Cara interna de la membrana**

Los poros de la cara interna de la membrana son de aproximadamente unos 10 nm de diámetro medio —según especificaciones de la casa comercial—, sin embargo, la observación de estos poros mediante microscopia electrónica de barrido no se pudo llevar a cabo debido a que el microscopio utilizado tenía una resolución que impedía observar poros de este tamaño.

### **Matriz de la membrana**

La matriz de la membrana es la zona que hay entre la cara externa y la interna de la membrana de microdiálisis y tiene un grosor medio de  $30,33 \pm 1,02 \mu\text{m}$ . Mediante microscopia electrónica de barrido se observó que esta matriz puede ser compacta o de estructura “esponjosa” y disponer de unas cavidades de disposición y estructura regular de distribución uniforme a lo ancho de toda la matriz. Estas cavidades se identificaron en los catéteres 1 y 2, en cambio, los catéteres 3 y 4 no disponían de dichas cavidades, teniendo una estructura compacta. La presencia de estas cavidades podría ser resultado del proceso de fabricación de las membranas de los catéteres de 100 kDa o bien deberse a un artefacto provocado durante la manipulación y la realización de la sección transversal de la membrana para su observación en el microscopio electrónico.

Los niveles de RR para la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  no se obtuvieron resultados) fueron siempre más elevados en el caso de los catéteres 1 y 2 que en los catéteres 3 y 4. Si suponemos que la presencia de las cavidades en la membrana de los dos primeros catéteres es una característica de fabricación propia de algunas membranas, esta diferencia de RR podría ser debido —entre otros factores— a que estas cavidades podrían facilitar el paso de las proteínas ya que no ofrecerían tanta resistencia como en el caso de la matriz compacta de los catéteres 3 y 4.

### **FENÓMENO DE BIOFOULING**

Mediante las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido de los catéteres utilizados para los experimentos de recuperación, se observaron algunas



agregaciones de partículas (probablemente agregaciones de proteínas). Estas agregaciones estaban adheridas a la superficie de la cara externa de la membrana así como en el interior de los poros.

Por razones técnicas (los cortes realizados en la membrana no permitían ver todo el grosor de la misma) por lo que este fenómeno, llamado de *biofouling*, sólo se pudo observar en la capa más superficial de la membrana. Sin embargo, es de suponer que esta adhesión de proteínas pudiera darse también en la matriz y la cara interna de la membrana. La acumulación de material biológico en los poros redujo el área total de los mismos afectando el paso de las proteínas a través suyo y reduciendo de esta manera la RR de las macromoléculas. Se observó que estas agregaciones, poco frecuentes en los experimentos *in vitro*, en algunos casos, ocluían completamente los poros de la cara externa, por lo tanto, en la membrana interna, donde los poros son de menor tamaño, es de esperar que este fenómeno pueda ser un factor que agrave aun más la disminución de la RR observada en estas citocinas.

Es esperable que los niveles de *biofouling* de los catéteres implantados en el parénquima cerebral humano serán mayores que *in vitro* debido a que, *in vivo*, no solamente intervendrán las proteínas de estudio y las células inflamatorias sino que además, durante los días que esté implantado el catéter en el parénquima se producirá una encapsulación del material biológico adherido a la membrana disminuyendo aun más la RR de las proteínas.

### **EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE RECUPERACIÓN VOLUMÉTRICA**

Estudios realizados por Helmy et al. demostraron que mediante el uso de agentes coloidosmóticos como la albúmina se conseguía una mayor recuperación volumétrica que cuando se usaba líquido de perfusión CNS sin albúmina (colocando el microvial de recogida a la misma altura que la bomba de perfusión y la punta de la membrana del catéter). En este último caso no consiguieron recuperar volumen hasta las primeras 12 horas del experimento y en las posteriores horas la recuperación de líquido no fue siempre constante (Helmy et al., 2009).

Los experimentos pilotos realizados en nuestro estudio para determinar la altura a la cual se debe colocar el microvial respecto a la punta de la membrana dializante para compensar las presiones hidrostáticas entre el medio externo y el microdializado demostraron que no es necesario añadir agentes coloidosmóticos (albúmina o dextrano) en el líquido de perfusión para que el volumen recuperado en el microvial sea el mismo que el esperado (18  $\mu\text{L}/\text{hora}$ ).

El segundo experimento piloto en el cual se perforó intencionadamente la membrana de microdiálisis de un catéter de 100 kDa mostró que un posible desgarro producido durante la implantación de un catéter *in vivo* podía afectar a la recuperación volumétrica de las proteínas. En esta situación, el líquido de perfusión saldría del catéter hacia el parénquima cerebral impidiendo la recuperación de las moléculas de interés.

## **DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTUDIO**

### **Factores que afectan a la RR de las proteínas**

La RR de las macromoléculas se ve influida por diversos factores relacionados con las moléculas de estudio y/o con la membrana dializante. Se sabe que el tamaño del poro de la membrana de microdiálisis (*cut-off*), la longitud y área de la membrana, la velocidad y composición del líquido de perfusión, la temperatura, el fenómeno de *biofouling* y las propiedades de la molécula de estudio influyen en la recuperación. En los experimentos *in vitro* realizados en este estudio se controlaron todos los parámetros no relacionados con las moléculas de interés: se utilizaron siempre catéteres de *cut-off* de 100 kDa, la velocidad de perfusión en todos los casos fue de 0,30  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ , los catéteres se perfundieron con líquido de perfusión CNS y el sistema siempre se mantuvo a una temperatura constante de 37°C. Por lo tanto, la baja RR observada en todas las citocinas del experimento se debió, seguramente, a factores propios de las moléculas diana.

Como se ha comentado anteriormente en la discusión, el fenómeno de *biofouling* influye en la RR de las macromoléculas ya que provoca la oclusión de algunos de

los poros de la membrana. Este fenómeno es siempre mucho más relevante cuando la recuperación se lleve a cabo *in vivo*, donde el catéter induce una respuesta tisular local.

Todas las citocinas diana de este estudio tienen un peso molecular (PM) entre 16,8 y 52,1 kDa, por lo tanto, en cuanto a esta característica (que es a la que hace referencia el *cut-off* de los catéteres de microdiálisis), todas las moléculas seleccionadas deberían poder pasar a través de la membrana de 100 kDa. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la RR de estas proteínas es siempre inferior a la esperada por su PM. Esto indica de forma clara que existen otros factores que influyen en la RR de estas macromoléculas. Debido a que sólo se obtuvieron datos de RR de algunas citocinas no se pudo determinar si el PM influyó en la recuperación de las mismas.

Una de las características que puede influir en la RR es el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. Según el pH que tenga la solución inicial, las proteínas estarán cargadas positiva o negativamente. En este estudio, el pH de la solución inicial utilizada fue de 7,29 y a este pH las proteínas IL-8 e IL-10 están cargadas positivamente y la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , negativamente. La carga de cada una de las proteínas a este pH puede influir en la RR de las mismas debido a que estas cargas pueden favorecer adherencias de las citocinas que presenten carga positiva como la IL-8 e IL-10 con la polietersulfona, el material que forma la membrana de microdiálisis, que está cargada negativamente. La influencia de este factor en la RR no se pudo confirmar en este estudio ya que la RR de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  no se pudieron calcular.

La forma de la proteína (estructura terciaria y conformación) y el peso molecular (PM) son otros de los factores que intervienen en la RR. El denominado radio de giración (*gyration radius*) de una molécula da una idea sobre el grado de compactación de la molécula. Las citocinas de estudio presentan un radio de giración entre 14,60 Å y 22,01 Å, es decir entre 1,460 y 3,548 nm. El PM y el radio de giración de una molécula son parámetros que se tienen en cuenta a la hora de calcular el coeficiente de difusión acuosa, parámetro que permite predecir la

eficiencia de extracción (EE) o recuperación relativa (RR) de las proteínas. Los coeficientes de difusión de las citocinas son bajos y este es uno de los motivos por el cual su RR no es muy elevada.

### **Recuperación relativa de las citocinas**

Waelgaard et al. realizaron estudios de recuperación relativa mediante catéteres con un *cut-off* de membrana de 100 kDa. Los resultados de RR que obtuvieron —a una velocidad de perfusión de 0,30  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ —, fueron del 75% para la IL-1 $\beta$ , del 11% para la IL-6, del 38% para la IL-8 (esta última a una velocidad de perfusión de 0,10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), del 8% para la IL-10 y del 4% para el TNF- $\alpha$  (Waelgaard et al., 2006).

Las RR obtenidas en nuestro estudio para la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-8 fueron más bajas que las obtenidas por otros autores (Waelgaard et al., 2006). Por otro lado, en el caso de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  las RR no se pudieron calcular debido a que los niveles de estas proteínas en el microdializado estaban por debajo del rango de detección de la técnica. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en este estudio, no podemos determinar un porcentaje fiable de RR para estas proteínas utilizando este tipo de catéteres y ser, de esta forma, extrapolados a estudios *in vivo*. Además, se han observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la RR de una misma molécula utilizando distintos catéteres. Esto muestra una gran variabilidad en la recuperación probablemente dependiente del lote del catéter de alta resolución.

La única diferencia observada entre la metodología de los estudios en los que el porcentaje de RR de las proteínas diana fue mayor que los obtenidos y nuestro estudio fue la adición en los primeros de agentes coloidosmóticos (albúmina o dextrano) en el líquido de perfusión. Esta adición tiene la finalidad de conseguir una recuperación volumétrica adecuada. En nuestro estudio, la falta de agentes coloidosmóticos se compensó mediante el control de la presión hidrostática entre el microvial de recogida y la punta de la membrana dializante. De esta forma la recuperación volumétrica fue siempre correcta. Por este motivo, sería necesario repetir los mismos experimentos *in vitro* de nuestro estudio, pero en esta ocasión, añadiendo agentes coloidosmóticos en el líquido de perfusión para poder verificar o

refutar si esta adición también puede influir, a parte de en la recuperación volumétrica, en el paso de las proteínas a través de los poros de la membrana.

### **RECUPERACIÓN RELATIVA DE LA ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

La albúmina sérica humana es estable durante largos períodos de tiempo a temperaturas de entre 2°C y 25°C. Los niveles de esta proteína determinados en la solución inicial eran los esperados (200 mg/L y 1000 mg/L), es decir, que en este caso, aunque los tubos que contenían la solución inicial se mantuvieron a 37°C durante 24 horas, la albúmina no se degradó.

Según estudios realizados por Rosenbloom et al. con catéteres de 100 kDa, la RR de la albúmina sin añadir dextrano al líquido de perfusión fue de  $14\pm 10\%$  después de 1 hora del inicio del experimento y disminuyó hasta un  $1,2\pm 0,6\%$  a las 8 horas. La RR mediante la adición de dextrano en el líquido de perfusión fue de  $5,6\pm 0,9\%$  al inicio y disminuyó por debajo del 1% a las 2 horas del inicio del experimento (Rosenbloom et al., 2005).

En nuestro estudio, la mediana de RR para la albúmina obtenida con los catéteres 1, 3 y 7, fue de 0,14% (rango 0,05-2,79), por lo tanto, este porcentaje es similar al obtenido por Rosenbloom et al. a las 8 horas del experimento (Rosenbloom et al., 2005). En nuestro estudio, los microviales se recogieron cada 8 o 12 horas y por lo tanto sólo se pudo comparar el porcentaje de RR de la albúmina a partir de las 8 horas.

Una de las posibles explicaciones de la baja RR de la albúmina es que en determinadas situaciones puede dimerizar y en este caso su peso molecular aumenta hasta 133,1 kDa. Con este tamaño, la proteína ya no podría pasar a través de los poros de la membrana de 100 kDa.

El punto isoeléctrico (pI) de la albúmina es de 5,92, por lo tanto, a un pH de 7,29 (pH de la solución inicial) esta molécula está cargada negativamente, por lo tanto la

proteína no sería atraída por la membrana a diferencia de lo que ocurre con las moléculas cargadas positivamente.

## RECUPERACIÓN RELATIVA DE METABOLITOS

Los resultados obtenidos por Afinowi et al. en membranas de *cut-off* de 100 kDa, mostraron que la RR de la glucosa, el lactato y el piruvato eran de  $88,1\pm 8,1\%$ ,  $93,4\pm 8,1\%$  y  $99,0\pm 15,4\%$  respectivamente (Afinowi et al., 2009). En otro estudio realizado por Hillman et al. utilizando el mismo tipo de catéteres y mediante la adición de albúmina al 3,5% en el líquido de perfusión, mostraron una RR de glucosa del 84,2% y del 83,8% para el glicerol, a una velocidad de perfusión de 0,30  $\mu\text{L}/\text{minuto}$  (Hillman et al., 2005). Según otros autores, (Hutchinson et al., 2005) la media de la recuperación relativa de los metabolitos en las mismas condiciones fue de: glucosa: de 95% a 105%; lactato: de 87% a 91% y piruvato: de 98% a 105%. Como se puede observar en la **Tabla 32**, los valores de RR obtenidos en los experimentos de nuestro estudio son similares a los proporcionados por la casa comercial CMA Microdialysis (CMA Microdialysis, Solna, Suecia).

**Tabla 32. Porcentajes de RR de los metabolitos del estudio.**

	Analizador CMA600		Resultados experimento	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango
<b>Glucosa</b>	103	(88,2-112,6)	72,13	(32,3-187)
<b>Lactato</b>	96	(74-114)	86,25	(20,7-207,4)
<b>Piruvato</b>	106	(104,7-108,1)	83,02	(10,6-278,5)
<b>Glicerol</b>	104	(91-114)	80,39	(33,7-203,1)

Comparación de los valores de RR obtenidos en los experimentos con los proporcionados por CMA Microdialysis (CMA Microdialysis, Solna, Suecia)

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Algunas limitaciones que consideramos relevantes en nuestro estudio son las siguientes: 1) Procesado de las muestras para microscopía electrónica, 2) Almacenamiento y degradación de las proteínas diana y 3) determinaciones mediante el sistema SearchLight™.

### 1. Procesado de las muestras para microscopía electrónica

El principal problema encontrado al procesar las muestras para su posterior análisis mediante microscopía electrónica de barrido fue la realización de los cortes longitudinales y transversales de la membrana de microdiálisis. Los cortes realizados se hicieron mediante un bisturí quirúrgico, de hoja muy fina, aun así, los fragmentos de membrana obtenidos no conservaron completamente su forma debido a la gran fragilidad de la membrana que provocaba su deformación durante el proceso de corte. Debido a este problema, el cálculo del grosor de la membrana fue muy complicado ya que el diámetro no distorsionado de los cortes transversales sólo se conservó en determinadas muestras.

### 2. Almacenamiento y degradación de las proteínas diana

Estudios realizados para comprobar la estabilidad de la IL-10 (Kenis et al., 2002) demostraron que la concentración de esta interleucina disminuía si se mantenía a 20°C durante 14 días y en sólo un día si se mantenía a temperaturas de 30-40°C. En nuestro estudio, cada tubo que contenía la solución inicial se mantuvo a 37°C durante 24 horas (cada día se cambiaba el tubo para minimizar la degradación). Según los resultados obtenidos en el catéter 4, se observó que efectivamente, los niveles de IL-10 en la solución inicial eran menores a los esperados. En este catéter se obtuvieron muestras de la solución inicial a las 0, 12 y 24 horas del inicio del experimento. A las 0 horas se observó una disminución considerable de la concentración de la proteína indicando que esta interleucina se degrada aun almacenándola a -80°C durante pocos días. La degradación se incrementó al poner la muestra en el baño a 37°C, pero en cambio no se observaron diferencias

estadísticamente significativas en la concentración de IL-10 entre las 12 y 24 horas. Para preparar la solución inicial se utilizó IL-10 liofilizada de un kit de array proteómico nuevo, por lo tanto la proteína estaba en buen estado.

El mismo problema sucedió con el TNF- $\alpha$ , dónde también se observó una disminución de la concentración de la proteína en la muestra inicial (muestra almacenada a -80°C) y una mayor degradación al poner la muestra a 37°C. La proteína utilizada para preparar la solución inicial también provenía de un kit de array proteómico nuevo, es decir, que debe asumirse que estaba en buen estado.

Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 detectados en la solución inicial del catéter 4 muestran que estas interleucinas se conservan bien tanto a -80°C como a 37°C durante al menos 24 horas. En el catéter 3, a parte de mantener la solución inicial a 37°C durante la recuperación de las proteínas, todas las muestras de microdializado y solución inicial fueron almacenadas a 4°C antes y después del experimento, factor que incrementó la degradación de las proteínas, en este caso, de las cinco citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ ). Los niveles de las citocinas eran tan bajos que incluso en determinadas ocasiones los niveles se encontraban fuera del rango de detección de la técnica. En los catéteres 1 y 2 los niveles de citocinas en la solución inicial no tuvieron en cuenta para el estudio de la degradación de las proteínas ya que los resultados no se consideraron correctos debido a que la placa de microarray proteómico Multiplex SearchLight™ posiblemente era defectuosa.

Existe otra técnica de determinación proteica, la espectrofotometría de masas, que detecta proteínas incluso si han sufrido degradación. Para futuros experimentos de RR sería útil confirmar previamente si la disminución de los niveles de proteínas en la solución inicial incluso antes de empezar el experimento es debida a su degradación durante el almacenamiento o a otros factores no contemplados en nuestro estudio.

### **3. Determinaciones mediante el sistema Multiplex SearchLight™**

La concentración de las citocinas añadida en la solución inicial de los catéteres 1, 2 y 3 fue de 32 pg/mL para la IL-1 $\beta$  e IL-6, 64 pg/mL para la IL-8 y la IL-10 y 384



pg/mL para el TNF- $\alpha$ . En la placa de array proteómico Multiplex SearchLight™ que se utilizó para determinar las concentraciones de las citocinas del catéter 1 (días 1-5) y de los días 4 y 5 del catéter 2, tres de los pocillos (correspondientes a tres muestras del catéter 1) no emitieron luminiscencia (**Figura 32**), igual que los pocillos correspondientes al estándar que no contenía proteína. Este hecho, hizo pensar que la placa pudiese ser defectuosa. Además, al determinar las concentraciones de las muestras del catéter 2 correspondientes a los días 1, 2 y 3, mediante otra placa, se observó que los niveles detectados de las concentraciones de la solución inicial eran los esperados a diferencia de las que se obtuvieron en la primera placa, de concentraciones más bajas. Es por este motivo que los resultados de RR de los catéteres 1 (días 1-5) y 2 (días 4 y 5) no se consideraron fiables y no se tuvieron en cuenta para el análisis de los resultados.



**Figura 32.** Imagen obtenida mediante el sistema de análisis SearchLight CCD. Esta imagen se obtuvo del análisis del catéter 1 y de los días 4 y 5 del catéter 2. La zona señalada no emitió luminiscencia, igual que el control\*, que no contiene proteína.

## FUTUROS ESTUDIOS

Para clarificar los resultados obtenidos es necesario realizar nuevos experimentos sobre los siguientes aspectos: 1) Recuperación relativa de las moléculas diana, 2) Características de la cara externa de la membrana, 3) Estructura de la cara interna

de la membrana, 4) Características de la matriz de la membrana y 5) Experimentos de recuperación volumétrica.

### **1. Recuperación relativa de las moléculas diana**

Para poder establecer un porcentaje estándar de RR *in vitro* para cada una de las macromoléculas de este estudio piloto (albúmina y citocinas) y poder extrapolar esta RR a futuros estudios *in vivo* es necesario incrementar el número de catéteres estudiados en los experimentos de recuperación. De los cuatro catéteres utilizados en el presente estudio sólo han sido útiles las muestras obtenidas del catéter 4 y de los días 1, 2 y 3 del catéter 2.

### **2. Características de la cara externa de la membrana**

Como se ha mencionado anteriormente, durante la observación de la cara externa de la membrana se describieron unos subgrupos de poros con menor tortuosidad repartidos por toda la superficie de la membrana generados probablemente durante la fabricación de las mismas. Para poder determinar si la presencia de estos grupos de poros podría modificar el porcentaje de la RR de las proteínas sería necesario el estudio mediante microscopía electrónica de barrido de esta característica en un mayor número de catéteres y además, comparar si la RR de las macromoléculas es diferente entre los catéteres que presentan este tipo de poros y los que no.

### **3. Estructura de la cara interna de la membrana**

Para poder corroborar los datos proporcionados por la casa comercial (CMA Microdialysis, Solna, Suecia) sobre la medida aproximada de los poros de la cara interna de la membrana sería necesario observar mediante microscopía electrónica de barrido muestras de la cara interna de la membrana dializante con un microscopio de mayor resolución y hacer las mediciones de las imágenes obtenidas mediante un programa de análisis de imágenes como el utilizado en este estudio, ImageJ 1.37v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

#### **4. Características de la matriz de la membrana**

Para determinar si las cavidades distribuidas a lo largo de toda la matriz de la membrana de diálisis son debidas al proceso de fabricación de las mismas o bien se produjeron como artefacto durante la sección de las membranas para la posterior observación mediante microscopía electrónica, sería necesario observar esta característica en un mayor número de catéteres. No puede descartarse que la estructura porosa o compacta de la membrana dializante pueda influir de forma significativa en los resultados de RR obtenidos. Es razonable pensar que la presencia de estas cavidades pudiera facilitar el paso de las proteínas a través de la membrana e incrementar la RR. Para verificar o refutar esta hipótesis es necesario hacer más experimentos de RR *in vitro* comparando catéteres con y sin estas cavidades.

#### **5. Experimentos de recuperación volumétrica**

Debido a la diferencia observada en los niveles de RR obtenidos en este estudio en comparación con los obtenidos en estudios previos por otros autores, se plantea la duda de si esta diferencia en la RR pudiera ser debida a la adición de agentes coloidosmóticos (albúmina o dextrano) en el líquido de perfusión. Nuestros estudios determinaron que para la recuperación volumétrica no era necesaria la adición de estos agentes en el líquido de perfusión pero queda por determinar si la adición de albúmina o dextrano puede incrementar la RR de las macromoléculas.

## CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que:

- 1) El tamaño de poro de la membrana o *cut-off* no es el único parámetro indicador de la recuperación relativa de las macromoléculas.
- 2) Es necesario realizar experimentos de recuperación con un mayor número de catéteres para poder determinar la RR para cada una de las moléculas de estudio (citocinas, metabolitos y albúmina), sobretodo en el caso de las macromoléculas.
- 3) La recuperación relativa de los metabolitos (moléculas de peso molecular bajo) es mucho más estable y predecible que la de las macromoléculas (citocinas y albúmina). Los metabolitos atraviesan con más facilidad la membrana de 100 kDa que las macromoléculas. Estas lo hacen de forma variable y errática.
- 4) La IL-10 y el TNF- $\alpha$  se degradan de forma muy rápida incluso cuando se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  y cuando se mantienen a temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$  más de 24 horas.
- 5) El uso de agentes coloidosmóticos (albúmina o dextrano) en el líquido de perfusión para evitar la pérdida de líquido a través de la membrana del catéter (fenómeno de ultrafiltración) no es necesario si la pérdida de líquido se compensa controlando las presiones hidrostáticas modificando la distancia entre el microvial de recogida y la punta de la membrana dializante. Aun así, existen indicios que indican que la adición de agentes coloidosmóticos en el líquido de perfusión puedan influir en el paso de macromoléculas a través de la membrana incrementando por lo tanto su RR.

## ABREVIATURAS

---

<b>À</b>	Amstrong
<b>AA</b>	Aminoácido
<b>BCG</b>	<i>Bromcresol green</i> , Verde de bromocresol
<b>C<sub>d</sub></b>	Concentración de la molécula de interés en el dializado
<b>C<sub>e</sub></b>	Concentración de la molécula de interés en el medio externo
<b>C<sub>i</sub></b>	Concentración de la molécula de interés en el líquido de perfusión
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CNS</b>	Central Nervous Sistem perfusion fluid, Líquido de perfusión
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>D</b>	Coeficiente de difusión acuosa
<b>D<sub>d</sub></b>	Coeficiente de difusión de la molécula en el dializado
<b>D<sub>m</sub></b>	Coeficiente de difusión de la molécula en la membrana
<b>D<sub>m</sub>Ø<sub>m</sub></b>	Coeficiente de difusión aparente de la membrana
<b>EE</b>	Eficiencia de extracción
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-1α</b>	Interleucina-1α
<b>IL-1β</b>	Interleucina-1β
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>J</b>	Flujo neto
<b>K</b>	Coeficiente de Boltzmann
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>kg/kmol</b>	Kilogramo/Kilomol
<b>L</b>	Longitud efectiva de la membrana de microdiálisis
<b>L/P</b>	Índice Lactato/Piruvato
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

<b>mmol/L</b>	Milimol/litro
<b>MWCO</b>	<i>Molecular weight cut-off</i> , tamaño de poro de la membrana
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>Pa·s</b>	Pascales · segundo
<b>pdb</b>	Protein Data Bank , base de datos de proteínas
<b>PES</b>	Polietersulfona
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>Q<sub>d</sub></b>	Velocidad del líquido de perfusión
<b>r<sub>0</sub></b>	Radio externo de la membrana de microdiálisis
<b>R<sub>bf</sub></b>	Resistencia que genera la capa de biofouling
<b>R<sub>d</sub></b>	Resistencia que genera el dializado
<b>R<sub>e</sub></b>	Resistencia que genera el medio externo
<b>R<sub>G</sub></b>	Radio de giración
<b>R<sub>m</sub></b>	Resistencia que genera la membrana
<b>R<sub>nt</sub></b>	Resistencia que genera el tejido normal
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RR</b>	Recuperación relativa
<b>R<sub>tr</sub></b>	Resistencia que genera el tejido lesionado
<b>r<sub>α</sub></b>	Radio externo de la cánula
<b>r<sub>β</sub></b>	Radio interno de la membrana de microdiálisis
<b>SD o DS</b>	<i>Standard deviation</i> o desviación estándar
<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscopy</i> o Microscopia electrónica de barrido
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>T</b>	Temperatura
<b>TC</b>	Tomografía computerizada
<b>TCE</b>	Traumatismo craneoencefálico
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral-α
<b>δC</b>	Diferencia de concentración a ambos lados de la membrana
<b>δr</b>	Distancia que tiene que atravesar la molécula
<b>η</b>	Viscosidad del medio externo
<b>μL/min</b>	Microlitro/minuto

## REFERENCIAS

---

1. Abbas AK, Lichtman AH: Citocinas, Inmunología Celular y Molecular. Madrid: Elsevier España,S.A, 2004, pp 243-274
2. Abrahamsson P, Winso O: An assessment of calibration and performance of the microdialysis system. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 39:730-734, 2005
3. Afinowi R, Tisdall M, Keir G, et al: Improving the recovery of S100B protein in cerebral microdialysis: implications for multimodal monitoring in neurocritical care. *J.Neurosci.Methods* 181:95-99, 2009
4. Allan SM, Rothwell NJ: Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat.Rev.Neurosci.* 2:734-744, 2001
5. Ao X, Rotundo RF, Loegering DJ, et al: In vivo microdialysis sampling of cytokines produced in mice given bacterial lipopolysaccharide. *J.Microbiol.Methods* 62:327-336, 2005
6. Ao X, Sellati TJ, Stenken JA: Enhanced microdialysis relative recovery of inflammatory cytokines using antibody-coated microspheres analyzed by flow cytometry. *Anal.Chem.* 76:3777-3784, 2004
7. Ao X, Stenken JA: Microdialysis sampling of cytokines. *Methods* 38:331-341, 2006
8. Ao X, Wang X, Lennartz MR, et al: Multiplexed cytokine detection in microliter microdialysis samples obtained from activated cultured macrophages. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40:915-921, 2006

9. Basu A, Krady JK, Levison SW: Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J.Neurosci.Res.* 78:151-156, 2004
10. Bellander BM, Cantais E, Enblad P, et al: Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care. *Intensive Care Med.* 30:2166-2169, 2004
11. Benveniste H: Brain microdialysis. *J.Neurochem.* 52:1667-1679, 1989
12. Bourne JA: Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 30:16-24, 2003
13. Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL: Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci.* 46:105-119, 1990
14. Chavarria A, Alcocer-Varela J: Is damage in central nervous system due to inflammation?. *Autoimmun.Rev.* 3:251-260, 2004
15. Clapp-Lilly KL, Roberts RC, Duffy LK, et al: An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. *J.Neurosci.Methods* 90:129-142, 1999
16. Clough GF: Microdialysis of large molecules. *AAPS.J.* 7:E686-E692, 2005
17. Cruz RM, Recio QF, Lopez Cortes LF, et al: Determination of shelf life and activation energy for tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid samples. *Clin.Chem.* 42:670-674, 1996
18. Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, et al: IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J.Neuroimmunol.* 101:211-221, 1999



19. Dahlin AP, Wetterhall M, Caldwell KD, et al: Methodological aspects on microdialysis protein sampling and quantification in biological fluids: an in vitro study on human ventricular CSF. *Anal.Chem.* 82:4376-4385, 2010
20. Duly EB, Grimason S, Grimason P, et al: Measurement of serum albumin by capillary zone electrophoresis, bromocresol green, bromocresol purple, and immunoassay methods. *J.Clin.Pathol.* 56:780-781, 2003
21. Eck MJ, Sprang SR: The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J.Biol.Chem.* 264:17595-17605, 1989
22. Friebe A, Volk HD: Stability of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 8 in blood samples of patients with systemic immune activation. *Arch.Pathol.Lab Med.* 132:1802-1806, 2008
23. Gosselin D, Rivest S: Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav.Immun.* 21:281-289, 2007
24. Gu LC, Erdos EA, Chiang HS, et al: Stability of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in aqueous solution: analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications. *Pharm.Res.* 8:485-490, 1991
25. Helmy A, Carpenter KL, Skepper JN, et al: Microdialysis of cytokines: methodological considerations, scanning electron microscopy, and determination of relative recovery. *J.Neurotrauma* 26:549-561, 2009
26. Hillered L, Persson L, Nilsson P, et al: Continuous monitoring of cerebral metabolism in traumatic brain injury: a focus on cerebral microdialysis. *Curr.Opin.Crit Care* 12:112-118, 2006

27. Hillered L, Valtysson J, Enblad P, et al: Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 64:486-491, 1998
28. Hillered L, Vespa PM, Hovda DA: Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis. *J.Neurotrauma* 22:3-41, 2005
29. Hillman J, Aneman O, Anderson C, et al: A microdialysis technique for routine measurement of macromolecules in the injured human brain. *Neurosurgery* 56:1264-1268, 2005
30. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Nortje J, et al: Cerebral microdialysis methodology--evaluation of 20 kDa and 100 kDa catheters. *Physiol Meas.* 26:423-428, 2005
31. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Rothwell NJ, et al: Inflammation in human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra. *J.Neurotrauma* 24:1545-1557, 2007
32. Kenis G, Teunissen C, De Jongh R, et al: Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum. *Cytokine* 19:228-235, 2002
33. Kushi H, Saito T, Makino K, et al: IL-8 is a key mediator of neuroinflammation in severe traumatic brain injuries. *Acta Neurochir.Suppl* 86:347-350, 2003
34. Lobanov MI, Bogatyreva NS, Galzitskaia OV: [Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure]. *Mol.Biol.(Mosk)* 42:701-706, 2008
35. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM: The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1:S232-S240, 2006

36. Maurer MH, Berger C, Wolf M, et al: The proteome of human brain microdialysate. *Proteome.Sci.* 1:7, 2003
37. Mellergard P, Aneman O, Sjogren F, et al: Changes in extracellular concentrations of some cytokines, chemokines, and neurotrophic factors after insertion of intracerebral microdialysis catheters in neurosurgical patients. *Neurosurgery* 62:151-157, 2008
38. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, et al: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765, 2001
39. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, et al: Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr.Opin.Crit Care* 8:101-105, 2002
40. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, et al: Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin.Chem.Lab Med.* 41:331-337, 2003
41. Reinstrup P, Stahl N, Mellergard P, et al: Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 47:701-709, 2000
42. Rosenbloom AJ, Sipe DM, Weedn VW: Microdialysis of proteins: performance of the CMA/20 probe. *J.Neurosci.Methods* 148:147-153, 2005
43. Rothwell NJ, Luheshi GN: Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23:618-625, 2000
44. Schutte RJ, Oshodi SA, Reichert WM: In vitro characterization of microdialysis sampling of macromolecules. *Anal.Chem.* 76:6058-6063, 2004

45. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA: Cerebrospinal fluid analysis. *Am.Fam.Physician* 68:1103-1108, 2003
46. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, et al: Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng* 12:439-446, 1999
47. Tisdall MM, Smith M: Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool. *Br.J.Anaesth.* 97:18-25, 2006
48. Ungerstedt U, Rostami E: Microdialysis in neurointensive care. *Curr.Pharm.Des* 10:2145-2152, 2004
49. Waelgaard L, Pharo A, Tonnessen TI, et al: Microdialysis for monitoring inflammation: efficient recovery of cytokines and anaphylotoxins provided optimal catheter pore size and fluid velocity conditions. *Scand.J.Immunol.* 64:345-352, 2006
50. Wang X, Lennartz MR, Loegering DJ, et al: Interleukin-6 collection through long-term implanted microdialysis sampling probes in rat subcutaneous space. *Anal.Chem.* 79:1816-1824, 2007
51. Wang X, Stenken JA: Microdialysis sampling membrane performance during in vitro macromolecule collection. *Anal.Chem.* 78:6026-6034, 2006
52. Wisniewski N, Klitzman B, Miller B, et al: Decreased analyte transport through implanted membranes: differentiation of biofouling from tissue effects. *J.Biomed.Mater.Res.* 57:513-521, 2001