

La metabolómica en el ictus isquémico, nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos

Gerard Mauri-Capdevila, Mariona Jové, Idalmis Suárez-Luis, Manuel Portero-Otín, Francisco Purroy

Resumen. El estudio de biomarcadores relacionados con el ictus isquémico está adquiriendo una mayor importancia en vistas de conocer mejor los cambios fisiopatológicos de la enfermedad cerebrovascular y facilitar un diagnóstico precoz. Dentro de este campo, la metabolómica ofrece un nuevo abordaje. Se define como el estudio de los metabolitos moleculares de pequeño tamaño derivados del metabolismo celular. Su interés radica en que, a partir de una muestra biológica, ofrece una instantánea de los cambios celulares que están aconteciendo. Actualmente, la aplicación de la metabolómica requiere una metodología compleja que incluye la aplicación de técnicas de separación de laboratorio, análisis estadísticos multivariantes y el empleo de herramientas bioinformáticas. Son múltiples los estudios en el ámbito de la enfermedad cardiovascular que se han centrado en aplicar este abordaje. En los últimos años ha ido en aumento el número de publicaciones referentes a los cambios metabólicos relacionados con el ictus isquémico, tanto en modelos animales como en pacientes. La metabolómica permite la obtención de perfiles de metabolitos que identifican a los pacientes que han sufrido un ictus isquémico. Además, dado que se han llevado a cabo estudios que relacionan metabolitos concretos con las etiologías más frecuentes del ictus isquémico, la metabolómica puede llegar a adquirir un papel significativo en el estudio del ictus criptogénico. El conocimiento más minucioso de los cambios en las vías metabólicas implicadas en la enfermedad cerebrovascular podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de neuroprotección.

Palabras clave. Biomarcadores. Diagnóstico. Fisiopatología. Ictus isquémico. Metabolitos. Metabolómica.

Introducción

La enfermedad cerebrovascular (ECV) constituye la causa más importante de discapacidad y una de las principales causas de mortalidad de los países industrializados [1]. Sin embargo, tanto el diagnóstico temprano como el pronóstico del ictus isquémico no se consideran una tarea sencilla. A pesar de que la tomografía computarizada, la resonancia magnética o los estudios neurosonológicos se han convertido en herramientas diagnósticas fundamentales, no es menos cierto que tienen una serie de limitaciones, entre las que cabe destacar la dependencia del observador, la falta de disponibilidad, el tiempo que precise la realización del estudio o su coste [2,3]. Por todo ello, es preciso el desarrollo de nuevas técnicas que faciliten tanto el diagnóstico como el pronóstico de la ECV. El estudio de biomarcadores está adquiriendo una importancia capital para identificar elementos que intervienen en los mecanismos fisiopatológicos del ictus y que, además, posibiliten un diagnóstico precoz, tanto del riesgo de sufrir un primer episodio como de su pronóstico y riesgo de recurrencia [4]. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún biomarcador con utilidad clínica validado

[5]. En los últimos años, la metabolómica está protagonizando un papel emergente en el estudio de diversas enfermedades neurológicas, como la enfermedad de motoneurona [6], la enfermedad de Parkinson [7], la enfermedad de Huntington [8] o la esclerosis múltiple [9]. También el ictus isquémico ha centrado la atención de la metabolómica. En publicaciones actuales se destaca cómo este abordaje podría llegar tanto a favorecer una mejor comprensión de la fisiopatología del ictus como a orientar al desarrollo de nuevos biomarcadores que faciliten el diagnóstico y el pronóstico tempranos [2,10]. El objetivo de esta revisión es exponer el concepto de metabolómica y mostrar los avances de su aplicación en el ictus isquémico.

Concepto de metabolómica

La metabolómica se define como el estudio de los metabolitos, es decir, moléculas de pequeño tamaño derivadas del metabolismo celular. Dicho estudio se puede llevar a cabo a partir de distintas muestras biológicas, como fluidos biológicos –orina, sangre, saliva o líquido cefalorraquídeo (LCR)–, tejidos o

Unidad de Ictus; Hospital Universitari Arnau de Vilanova; Grupo de Neurociencias Clínicas; Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, IRBLleida; Universitat de Lleida (G. Mauri-Capdevila, I. Suárez-Luis, F. Purroy). Centro NUTREN-Nutrigenomics; Departamento de Medicina Experimental; Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida; IRBLleida; Universitat de Lleida (M. Jové, M. Portero-Otín). Lleida, España.

Correspondencia:

Dr. Francisco Purroy García. Unidad de Ictus. Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Grupo de Neurociencias Clínicas. IRBLleida. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure, 80. E-25198 Lleida.

E-mail:

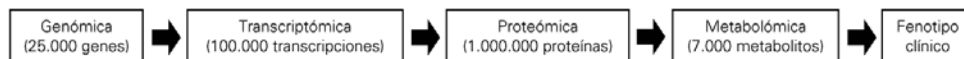
fpurroygarcia@gmail.com

Aceptado tras revisión externa: 15.05.13.

Cómo citar este artículo:

Mauri-Capdevila G, Jové M, Suárez-Luis I, Portero-Otín M, Purroy F. La metabolómica en el ictus isquémico, nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos. Rev Neurol 2013; 57: 29-36.

© 2013 Revista de Neurología

Figura 1. Relación de las ciencias ‘-ómicas’.

incluso la exhalación [2,11-14]. Los conceptos de metabolómica y de metabonomía no describen exactamente el mismo proceso [15]. Se considera que la metabolómica se centra en el análisis intra y extracelular de sistemas biológicos simples, mientras que la metabonomía se encarga del estudio de la respuesta metabólica ante estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas [16,17].

La importancia de los metabolitos radica en que son el resultado de la interacción del genoma y el epigenoma con el entorno del individuo. Más allá de representar el producto final de la expresión génica, conforman parte de los medios reguladores, y son parte esencial de la integración entre los distintos sistemas biológicos (genómico, transcriptómico y proteómico) [18]. Por tanto, la metabolómica aporta una perspectiva novedosa en cuanto a la comprensión de la fisiopatología, en tanto que el conocimiento de los cambios en los niveles de metabolitos proporciona una estimación a tiempo real de la respuesta metabólica a la enfermedad [19].

El número relativamente pequeño de metabolitos humanos (≈ 7.000), en comparación con el número estimado de genes (25.000), transcripciones (100.000) y proteínas (1.000.000), condiciona que la metabolómica pueda tener un mejor manejo de datos respecto al resto de disciplinas ‘-ómicas’ (Fig. 1). Sin embargo, los metabolitos presentan un rango amplio de concentraciones y una gran diversidad química, por lo que no existe en la actualidad ningún instrumento que pueda medir fiablemente todos los metabolitos del metaboloma humano en un solo análisis [20].

Por otro lado, su determinación va a depender, más allá de la naturaleza química del compuesto, de factores como el origen de la muestra, el sistema elegido para la detección del metabolito, diferencias en dieta y estilo de vida, y cambios dinámicos en el metabolismo celular y tisular, entre otros [13, 15,16]. El desarrollo de la metabolómica se relaciona íntimamente con los avances en la capacidad de análisis matemáticos y estadísticos que permitan la determinación y comparación de miles de entidades químicas [21].

Aproximación metodológica a la metabolómica

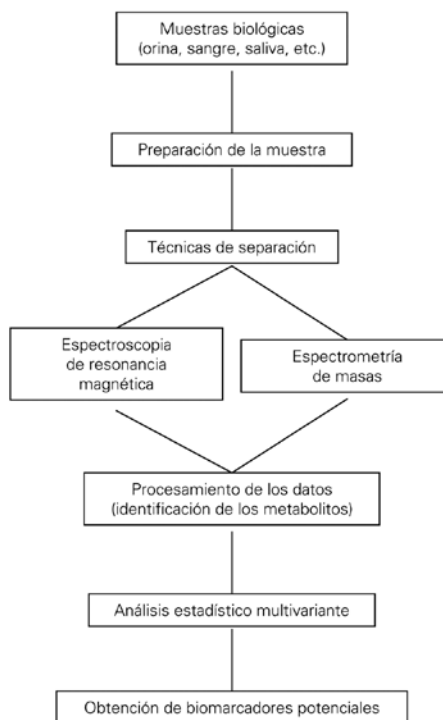
Actualmente, el procedimiento es complejo técnicamente. Se trata de establecer los cambios existentes en miles de moléculas de modo comparable, cuando la diferencia en su concentración puede alcanzar diversos órdenes de magnitud. La obtención de un perfil metabolómico implica aislar metabolitos, realizar su determinación y, finalmente, analizar los datos obtenidos mediante herramientas bioinformáticas con el objetivo de establecer diferentes relaciones que definan sistemas biológicos [22]. Se consideran predominantemente dos técnicas analíticas distintas para llevar a cabo los estudios metabolómicos [23]. Por un lado, destaca la técnica de espectrometría de masas (EM), que precisa una manipulación específica para derivar un metabolito determinado a formas iónicas, que son más fácilmente identificables a partir de bases de datos existentes, como METLIN, KEGG (*Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes*) o *Human Metabolome Database*, entre otras [20,24-26]. En este sentido, al contrario de la genómica, la proteómica y la transcriptómica, no existe ninguna regla para indicar qué metabolitos pueden esperarse para una determinada constitución génica, hecho que dificulta considerablemente la identificación de los metabolitos y, por consiguiente, la interpretación de los resultados [27]. Generalmente, la EM se combina con técnicas de separación [16], como la cromatografía de gases (CG), la cromatografía líquida (CL) y la electroforesis capilar, para incrementar su resolución. La EM-CL está considerada como la más significativa, debido a su sensibilidad y a la gran información que aporta. Más recientemente, se ha ido instaurando un nuevo abordaje que ha mejorado significativamente la resolución cromatográfica, la CL de ultraalta resolución [28]. Por otro lado, la espectroscopia de resonancia magnética (RMe) es la otra técnica analítica que se debe considerar para el desarrollo de los estudios metabolómicos. La RMe generalmente se utiliza para la detección de los átomos de hidrógeno de los metabolitos. Las moléculas

las de la muestra que contienen hidrógeno, incluyendo la mayoría de metabolitos, configurarán el llamado espectro $^1\text{H-RMe}$ [15]. Característicamente, la aplicación de la RMe va a permitir la obtención rápida de análisis metabolómicos tanto de muestras *in vitro* como *in vivo*, dado que no va a requerir una manipulación química de la muestra. La RMe facilita el procesamiento de una gran cantidad de metabolitos a partir de una muestra y, además, conduce a un análisis no destructivo que proporciona la opción de recuperar las muestras y una elevada reproducibilidad [23]. Sin embargo, la RMe ofrece una relativa baja sensibilidad, a diferencia de la EM, que muestra unas elevadas sensibilidad y especificidad (Fig. 2).

En cualquiera de ambas modalidades metodológicas, la metabolómica diferencia dos abordajes distintos: dirigido y no dirigido. El abordaje dirigido requiere que el investigador conozca previamente aquellos metabolitos que deben centrar el interés del patrón metabolómico; por tanto, su objetivo es la identificación y cuantificación de un determinado grupo de metabolitos. Las principales limitaciones de este abordaje hacen referencia a la valoración de grandes cantidades de metabolitos, las fluctuaciones metabólicas y la evaluación de nuevos productos del metabolismo [29]. El estudio dirigido puede llevarse a cabo mediante técnicas de EM. El estudio no dirigido se obtiene a partir del análisis de gran cantidad de metabolitos con el fin de establecer diferencias entre los perfiles metabolómicos de varias situaciones clínicas. En este caso es preciso realizar un análisis espectral y químico de los datos obtenidos a partir de las técnicas de separación, RMe o EM, para determinar los metabolitos hallados [20].

Independientemente del abordaje aplicado, la interpretación de los datos resulta compleja. Consecuentemente, la aplicación de análisis estadísticos específicos, como los de multivarianza y análisis de *clustering*, facilita el procesamiento de los datos obtenidos originariamente en forma de picos espectrales para identificar unas coordenadas indicativas de la actividad metabólica. Este procedimiento determina los perfiles metabolómicos característicos y específicos [30]. Los análisis multivarianza se dividen en dos categorías: métodos supervisados y no supervisados. Los métodos no supervisados tienen la finalidad de hallar y ordenar los elementos químicos que permiten diferenciar las muestras biológicas, por ejemplo, entre casos y controles. El llamado análisis de componentes principales es la técnica más común de los métodos no supervisados. El rasgo característico de los métodos supervisados es que, a partir de los datos de un grupo conocido, se cons-

Figura 2. Representación esquemática de la metodología de la metabolómica.



truye un modelo predictivo que permita identificar potenciales biomarcadores. Una de las principales técnicas de los métodos supervisados es el análisis de mínimos cuadrados parciales [28].

Como se ha mencionado, la obtención de perfiles metabolómicos puede proceder de distintas muestras biológicas. A tenor de la patología que nos ocupa, cabe suponer que la orina, la sangre o el LCR van a ser las procedencias muestrales más significativas. Sin embargo, los autores no tienen constancia de la publicación de estudios de metabolómica en pacientes con ictus isquémico a partir de muestras de LCR. A pesar de que el LCR puede ser una fuente para el hallazgo de biomarcadores de patologías del sistema nervioso central, muchos metabolitos del LCR no se han identificado y, además, la obtención de perfiles metabolómicos resulta dificultosa, debido a su baja concentración de metabolitos en comparación con las muestras sanguíneas [12]. En cambio, en la bibliografía existen sendos estudios que han utilizado muestras sanguíneas [10] y urinarias [2] para el estudio metabolómico de pacientes con

ictus isquémico. La facilidad de la obtención de muestras de sangre explica que la mayoría de publicaciones se centren en esta procedencia para la búsqueda de biomarcadores con utilidad clínica [3]. La sangre es la encargada de mantener una homeostasis normal a través de mecanismos reguladores. Por tanto, la determinación de perfiles metabólicos procedentes de plasma o suero va a ilustrar el estado metabólico de ese momento [28]. La obtención de perfiles metabólicos en orina puede estar más indicada para aquellos metabolitos que se eliminen con mayor celeridad del torrente circulatorio [31]; no obstante, dichos perfiles podrían ser más dependientes de los cambios dietéticos [13].

Investigaciones precedentes en el ámbito de la enfermedad cardiovascular

La metabolómica ofrece un abordaje novedoso para el estudio del ictus, puesto que facilita una instantánea del metabolismo celular. Este abordaje, por consiguiente, conlleva un mayor entendimiento de la fisiopatología de la ECV e introduce la posibilidad de obtener nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos, con las reservas indicadas anteriormente sobre la representatividad de la muestra respecto al problema clínico.

Son múltiples los estudios de metabolómica que se han centrado en el hallazgo de marcadores en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo coronariopatía, infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca [20]. Como más representativo, cabe comentar un estudio en el que se incluyeron 1.011 pacientes que fueron sometidos consecutivamente a un cateterismo cardíaco [32]. De este numeroso grupo, se logró un seguimiento durante tres años en 955 individuos con el fin de determinar la incidencia de desarrollo de episodios adversos cardiovasculares mayores –muerte, infarto de miocardio no fatal e ictus no fatal– y enfermedad arterial coronaria significativamente obstructiva –definida por la presencia de antecedentes de infarto de miocardio, intervención coronaria percutánea, cirugía de revascularización coronaria, evidencia angiográfica de enfermedad arterial coronaria (estenosis $\geq 50\%$) en una o más de las principales arterias coronarias–. Mediante el análisis de plasma de estos pacientes, se determinó que el grupo diagnosticado de enfermedad arterial coronaria por angiografía (608 sujetos) tenía un patrón característico de metabolitos relacionados con la disminución en la producción de óxido nítrico; concretamente, unos niveles elevados de dimetilarginina asimétrica (ADMA)

y dimetilarginina simétrica (SDMA), y unos valores disminuidos de N-mono-metilarginina (MMA). También constataron que el índice de metilación de arginina ($[ADMA + SDMA] / MMA$) es una herramienta independiente de predicción de riesgo de episodios adversos cardiovasculares mayores. El incremento plasmático de ADMA también se ha relacionado con un mayor riesgo de ictus isquémico [33,34]. El mismo grupo de investigadores, en otra publicación y siguiendo la estela de las vías metabólicas del óxido nítrico, estableció la utilidad del cociente de biodisponibilidad global de arginina (arginina / [ornitina + citrulina]) para la valoración de pacientes con mayor riesgo cardiovascular [35]. Evidenciaron que unos valores bajos de dicho cociente se relacionaban con enfermedad arterial coronaria y un mayor riesgo de episodios adversos cardiovasculares mayores. Un estudio, que se basó en las determinaciones metabólicas de 36 pacientes que realizaron una prueba de esfuerzo cardíaca siguiendo el protocolo Bruce, puso de manifiesto perfiles metabólicos que diferenciaban a los que habían sufrido una isquemia inducible [36]. Concretamente, la disminución en los niveles circulantes de metabolitos implicados en la vía del ácido cítrico permitía diferenciar a los pacientes que habían sufrido una isquemia inducible. El ciclo del ácido cítrico interviene en la fosforilación oxidativa del miocardio. Shah et al [19] obtuvieron el perfil metabólico de más de 2.000 pacientes, a los que también se les practicó un cateterismo cardíaco y tuvieron un seguimiento de tres años. Mediante técnicas de EM que se siguieron de un análisis de componentes principales, identificaron perfiles metabólicos caracterizados por dicarboxilacilcarnitinas, acilcarnitinas de cadena media y ácidos grasos, que constituyen factores predictivos independientes de eventos cardiovasculares y permiten mejorar el grupo de riesgo de los pacientes. Por tanto, en la bibliografía existen amplios estudios que apoyan la utilidad de la aplicación de la metabolómica tanto para el diagnóstico como para la evaluación del riesgo cardiovascular.

Aplicación de la metabolómica en el ictus isquémico

Los mecanismos metabólicos y moleculares de la hipoxia aguda (infarto de miocardio o ictus) suelen diferir de la hipoxia de instauración crónica (enfermedad pulmonar o cáncer). Inicialmente, tras una oclusión vascular se inicia un proceso de desoxigenación tisular, seguido del agotamiento del adeno-

sín trifosfato (ATP) –colapso mitocondrial–, que conlleva un descenso en el aporte energético. En esta fase también se evidencian fallos en la membrana celular, que se traducen en un incremento de los productos del catabolismo de fosfolípidos; y aumentos en los niveles de succinato fruto de la inhibición del ciclo de Krebs (o de los ácidos tricarbóxicos) [37]. En los últimos años ha ido en aumento el número de publicaciones referentes a los cambios metabólicos relacionados con el ictus isquémico, tanto en pacientes (Tabla) como en modelos animales. Con el objetivo de mejorar el conocimiento de los cambios neuroquímicos que se producen en el ictus, se destaca un estudio en el que se aplicó la técnica de RMe a un grupo de ratas de la cepa Sprague-Dawley a las que se había provocado una oclusión de la arteria cerebral media [38]. Los resultados se compararon con los obtenidos de un grupo de ratas que no fueron sometidas a la oclusión arterial. Se obtuvo un perfil metabolómico que permitió identificar a las ratas con la oclusión de la arteria cerebral media. Estas ratas sufrieron alteraciones en el ciclo de Krebs, en la derivación del ácido gamma aminobutírico y en el metabolismo de la colina y de los ácidos nucleicos, que los diferenciaron del grupo control. Koizumi et al [39] realizaron un interesante estudio aplicando la formación de imágenes por medio de la EM en muestras procedentes de ratas de la cepa Sprague-Dawley sacrificadas a las 24 horas de la oclusión intencionada de la arteria cerebral media izquierda. Los investigadores pusieron de manifiesto un proceso de conversión dinámica de fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina en las áreas cerebrales con lesiones isquémicas. Este hallazgo fundamentaría la hipótesis de que la lisofosfatidilcolina, cuya producción está inducida en el núcleo isquémico y el área de penumbra, participa en la progresión del daño isquémico. Otro grupo japonés, utilizando un abordaje similar al del estudio previo, halló una elevación paradójica de ATP en la penumbra isquémica de los ratones evaluados [40]. Dicha elevación sugeriría que es posible mantener cierto aporte energético a pesar de una perfusión limitada. La perspectiva que puede ofrecer este tipo de estudios es la de ampliar el conocimiento de los cambios metabólicos que ocurren en el seno del ictus isquémico para facilitar en un futuro nuevos tratamientos neuroprotectores. Entre las limitaciones del trabajo y su extrapolación al medio clínico cabe indicar que se desconoce de qué modo los cambios en el metaboloma tisular influyen en cambios en el metaboloma circulante.

En este sentido, Jung et al [2] obtuvieron los perfiles metabólicos plasmáticos y urinarios de pacien-

Tabla. Metabolitos relacionados con el ictus isquémico.

	Población (pacientes con ictus/controles)	Muestra	Alteración	Metabolitos
Ghandforoush-Sattari et al [42]	60/54	Plasma	Elevación	Taurina
Jiang et al [10]	67/62	Suero	Elevación	Cisteína, S-adenosil-homocisteína, glutatión oxidado, ácido hidroxieicosatetraenoico, ácido hidroxiocetadecadienoico
			Disminución	Ácido fólico, tetrahidrofolato, adenosina, aldosterona, deoxocatasterona, sacarosa 6-fosfato, betanina
Jung et al [2]	54/47	Plasma	Elevación	Lactato, glicolato, piruvato, formiato
			Disminución	Valina, metanol, glutamina
	28/30	Orina	Disminución	Creatinina, glicina, hipurato
Kelly et al [45]	52/27	Plasma	Elevación	F2-isoprostanos
Naccarato et al [43]	10/8	Plasma	Elevación	Anandamida
Pilz et al [46]	61/3.244 ^a	Suero	Disminución	Homoarginina

^a Estudio realizado en una muestra de 3.305 individuos que se sometieron a una angiografía coronaria, 61 de los cuales padecieron ictus fatales.

tes que habían sufrido un ictus isquémico secundario a la afectación de un pequeño vaso, que compararon con los obtenidos de una población de individuos sanos. Mediante la aplicación de un abordaje que asoció técnicas de ¹H-RMe y análisis estadístico multivariante, establecieron diferencias significativas en los perfiles metabolómicos de ambos grupos. Los pacientes que habían padecido un ictus estaban caracterizados por presentar en el plasma unos niveles elevados de lactato, glicolato, piruvato y formiato; y una disminución de valina, metanol y glutamina. En cambio, el análisis de las muestras urinarias evidenció que el grupo de pacientes presentaba un decremento en la excreción de citrato, dimetilamina, creatinina, glicina e hipurato. La diferencia hallada en los niveles de metabolitos de los dos grupos se contextualiza por el papel que podrían tener la glucólisis anaeróbica, la deficiencia de ácido folato y la hiperhomocisteinemia en el desarrollo del ictus isquémico. También cabe señalar otra publicación que comparó los datos de muestras séricas de un grupo 67 pacientes con ictus is-

quémico con un grupo control compuesto por 62 individuos [10]. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo mediante CL de ultraalta resolución en asociación con el espectrómetro de masas por tiempo de vuelo. Tras el análisis estadístico multivariante, se identificaron 12 metabolitos que presentaban unas diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos: ácido fólico, cisteína, tetrahidrofolato, S-adenosil-homocisteína, glutatión oxidado, ácido hidroxieicosatetraenoico, deoxocasterona, sacarosa 6-fosfato y betaína. Estos metabolitos pertenecen a distintas vías metabólicas del organismo. Sin embargo, es preciso destacar los participantes en el ciclo del átomo de carbono (como ácido fólico, cisteína y S-adenosil-homocisteína). Además, considerando el hallazgo del glutatión oxidado, se establece la importancia de las especies reactivas de oxígeno en la patogenia del ictus isquémico. La cuantificación de moléculas concretas también ha centrado el interés de grupos de investigación mediante una aproximación dirigida, descrita anteriormente. Éste es el caso de la taurina, aminoácido inhibidor que se ha relacionado con mecanismos de neuromodulación y de neuroprotección [41]. Mediante la aplicación de CL de ultraalta resolución a muestras plasmáticas, se constató que los niveles de taurina en plasma eran significativamente mayores en pacientes que habían sufrido un ictus isquémico ($136,9 \pm 8,2$ mmol/L). Este hallazgo se asoció a la lesión de tejido cerebral ocasionada por la isquemia [42].

Uno de los pilares de los perfiles metabolómicos es que transmiten una información sobre los cambios del metabolismo celular que están sucediendo en el momento de la extracción de la muestra. En este sentido, destacamos una investigación cuyo diseño se basó en la valoración de anandamida (AEA) y palmitoiletanolamida (PEA) en muestras plasmáticas recogidas de dos grupos de sujetos (pacientes que habían sufrido un ictus isquémico y un grupo de controles) en tres momentos evolutivos distintos (en el momento del ingreso, a las seis horas y a las 18 horas) [43]. Se constató que el grupo de pacientes que habían sufrido un ictus isquémico ($n = 10$) tenía unos niveles incrementados de AEA en la muestra inicial respecto al grupo control ($n = 8$). No se hallaron diferencias remarcables en las determinaciones de PEA. Los niveles de AEA presentaron una correlación positiva con el deterioro neurológico y con el volumen de la lesión isquémica de la tomografía computarizada. Sin embargo, los niveles de AEA y de PEA no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en las muestras posteriores. Se ha descrito que la AEA y la PEA son lípi-

dos que intervienen en el sistema endocannabinoide, que se ha incluido en la respuesta mediadora ante el daño isquémico [44]. Otras publicaciones se han focalizado en la valoración de otras moléculas de forma dirigida. Los F2-isoprostanos, surgidos de la peroxidación del ácido araquidónico, son marcadores del estrés oxidativo inducido por la peroxidación lipídica. Los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos estaban incrementados en un grupo de 52 pacientes que habían ingresado consecutivamente por ictus isquémico, respecto a las muestras obtenidas en 27 controles sanos [45]. Por otro lado, se ha descrito que unos niveles disminuidos de homoarginina, relacionados con el metabolismo del óxido nítrico, podrían asociarse a ECV de mal pronóstico [46].

El interés de la metabolómica puede ir más allá que preguntarse si un paciente ha padecido un ictus isquémico o cuál puede ser su pronóstico. Los ictus sin una etiología definida a pesar de un estudio amplio, llamados ictus criptogénicos, suponen el 30-40% de todos los ictus [47]. Esta situación justifica especialmente las investigaciones que den lugar al descubrimiento de biomarcadores que permitan facilitar la racionalización de los estudios complementarios. En este sentido, la obtención de perfiles metabolómicos podría hacer emerger biomarcadores que facilitaran el diagnóstico de la fibrilación auricular. Mayr et al [48] pusieron de manifiesto que incrementos del β -hidroxibutirato permitirían identificar a un grupo de pacientes con fibrilación auricular. La identificación de marcadores metabolómicos de la arterioesclerosis también ha sido objeto de estudio. Se ha descrito que un ácido graso, el palmitato, podría ejercer como biomarcador fenotípico de la arterioesclerosis [49]. Teul et al [50] adoptaron un abordaje no dirigido para el análisis plasmático de nueve sujetos con arterioesclerosis de carótida y de 10 individuos sanos. Tras utilizar dos técnicas de separación, EM-CG y $^1\text{H-RMe}$, concluyeron que los individuos con arterioesclerosis de carótida estaban caracterizados por un perfil metabolómico implicado con la resistencia a la insulina y, por extensión, con el síndrome metabólico.

La metabolómica presenta una serie de limitaciones. Es una ciencia que conlleva una dificultad técnica a pesar de los avances en las herramientas de análisis. Por otro lado, a pesar de que se trabaja para la identificación del metaboloma humano [51], es preciso establecer el papel que desempeñan los metabolitos determinados en las múltiples vías metabólicas que rigen las respuestas celulares a los estímulos, como un ictus isquémico. Finalmente, el perfil metabolómico puede verse condicionado por numerosos factores: dieta, edad, grupo étnico, fár-

macos, estilo de vida o microflora intestinal [28]. Dentro de los fármacos que podrían interferir en los estudios metabolómicos, se han destacado los inhibidores de la HMG-CoA reductasa [52] y los beta-bloqueadores [53], si bien es de esperar que cualquier fármaco o agente que modifique la actividad celular conducirá a cambios más o menos marcados del metabolismo y, por ende, del perfil metabolómico.

Conclusiones

La aplicación de la metabolómica en el ictus isquémico es un campo prometedor. La metabolómica puede abrir la puerta a la mejoría del conocimiento de los cambios celulares que acontecen con el advenimiento del ictus isquémico y, de este modo, proporcionar nuevas herramientas diagnósticas y pronósticas derivadas del desarrollo de nuevos biomarcadores. La metabolómica podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de neuroprotección, habida cuenta de la adquisición de nuevas dianas terapéuticas.

Bibliografía

- Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, Sarti C, et al. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke* 2009; 40: 1557-63.
- Jung JY, Lee HS, Kang DG, Kim NS, Cha MH, Bang OS, et al. 1H-NMR-based metabolomics study of cerebral infarction. *Stroke* 2011; 42: 1282-8.
- Laborde CM, Mourino-Álvarez L, Akerstrom F, Padial LR, Vivanco F, Gil-Dones F, et al. Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics* 2012; 9: 437-49.
- Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 (Suppl 1): S7-18.
- Wong DTH, George K, Wilson J, Manhiot C, McCrindle BW, Adeli K, et al. Effectiveness of serial increases in amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels to indicate the need for mechanical circulatory support in children with acute decompensated heart failure. *Am J Cardiol* 2011; 107: 573-8.
- Rozen S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, Matson WR, Kristal BS, Beecher C, et al. Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics* 2005; 1: 101-8.
- Bogdanov M, Matson WR, Wang L, Matson T, Saunders-Pullman R, Bressman SS, et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131: 389-96.
- Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, Ellis DI, Michell AW, Vacher C, et al. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain* 2006; 129: 877-86.
- Gonzalo H, Brieva L, Tatzber F, Jové M, Cacabelos D, Cassanyé A, et al. Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *J Neurochem* 2012; 123: 622-34.
- Jiang Z, Sun J, Liang Q, Cai Y, Li S, Huang Y, et al. A metabolomic approach applied to predict patients with cerebral infarction. *Talanta* 2011; 84: 298-304.
- Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 168: 1718-27.
- Stoop MP, Coulier L, Rosenling T, Shi S, Smolinska M, Buydens L, et al. Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 2063-75.
- Yap IKS, Brown IJ, Chan Q, Wijeyesekera A, García-Pérez I, Bictash M, et al. Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate north and south Chinese populations at differing risks of cardiovascular disease: INTERMAP study. *J Proteome Res* 2010; 9: 6647-54.
- Sofia M, Maniscalco M, De Laurentiis G, Paris D, Melck D, Motta A. Exploring airway diseases by NMR-based metabolomics: a review of application to exhaled breath condensate. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 403260.
- Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabolomics. *Nature* 2008; 455: 1054-6.
- Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 2005; 130: 606-25.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-9.
- Rochford S. Metabolomics reviewed: a new 'omics' platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod* 2005; 68: 1813-20.
- Shah SH, Sun JL, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer MJ, Pieper KS, et al. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease. *Am Heart J* 2012; 163: 844-50.
- Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation* 2012; 126: 1110-20.
- Idle JR, González FJ. Metabolomics. *Cell Metab* 2007; 6: 348-51.
- Schadt EE, Zhang B, Zhu J. Advances in systems biology are enhancing our understanding of disease and moving us closer to novel disease treatments. *Genetica* 2009; 136: 259-69.
- Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabolomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 443-58.
- Sana TR, Roark JC, Li X, Waddell K, Fischer SM. Molecular formula and METLIN Personal Metabolite Database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. *J Biomol Tech* 2008; 19: 258-66.
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KE, Itoh M, Kawashima S, et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D354-7.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0 –The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* 2012; 41: 801-7.
- Wishart DS. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* 2011; 3: 1769-82.
- Gowda GN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 617-33.
- Goonewardena SN, Prevette LE, Desai A. Metabolomics and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12: 267-72.
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research and development. *Pharm Res* 2006; 23: 1075-88.
- Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 117-23.
- Wang Z, Tang WHW, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1383-91.
- Mamatha SN, Nagaraja D, Philip M, Christopher R. Asymmetric dimethylarginine as a risk marker for early-onset ischemic stroke in Indian population. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 139-42.

34. Yoo J, Lee S. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001; 158: 425-30.
35. Tang WHW, Wang Z, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 2061-7.
36. Sabatine MS, Liu E, Morrow D, Heller E, McCarroll R, Wiegand R, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation* 2005; 112: 3868-75.
37. Serkova NJ, Reisdorph N, Tissot van Patot MC. Metabolic markers of hypoxia: systems biology application in biomedicine. *Toxicol Mech Methods* 2008; 18: 81-95.
38. Yang M, Wang S, Hao F, Li Y, Tang H, Shi X. NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion. *Talanta* 2012; 88: 136-44.
39. Koizumi S, Yamamoto S, Hayasaka T, Konishi Y, Yamaguchi-Okada M, Goto-Inoue N, et al. Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. *Neuroscience* 2010; 168: 219-25.
40. Hattori K, Kajimura M, Hishiki T, Nakanishi T, Kubo A, Nagahata Y, et al. Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 1157-67.
41. Saransaari P, Oja SS. Taurine and neural cell damage. *Amino Acids* 2000; 19: 509-26.
42. Ghandforoush-Sattari M, Mashayekhi SO, Nemati M, Ayromlou H. Changes in plasma concentration of taurine in stroke. *Neurosci Lett* 2011; 496: 172-5.
43. Naccarato M, Pizzuti D, Petrosino S, Simonetto M, Ferigo L, Grandi FC, et al. Possible anandamide and palmitoylethanolamide involvement in human stroke. *Lipids Health Dis* 2010; 9: 47.
44. Tuma RF, Steffens S. Targeting the endocannabinoid system to limit myocardial and cerebral ischemic and reperfusion injury. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 46-58.
45. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke* 2008; 39: 100-4.
46. Pilz S, Tomaschitz A, Meinitzer A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, et al. Low serum homoarginine is a novel risk factor for fatal strokes in patients undergoing coronary angiography. *Stroke* 2011; 42: 1132-4.
47. Guercini F, Acciarresi M, Agnelli G, Paciaroni M. Cryptogenic stroke: time to determine aetiology. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 549-54.
48. Mayr M, Yusuf S, Weir G, Chung YL, Mayr U, Yin X, et al. Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 585-94.
49. Chen X, Liu L, Palacios G, Gao J, Zhang N, Li G, et al. Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis. *J Sep Sci* 2010; 33: 2776-83.
50. Teul J, Rupe FJ, García A, Vaysse J, Malet-Martino M, Martín-Ventura JL, et al. Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and 1H NMR fingerprints. *J Proteome Res* 2009; 8: 5580-9.
51. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS One* 2011; 6: e16957.
52. Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace A, Schofield PM, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* 2006; 12: 705-10.
53. Teul J, García A, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Tarín N, Bescós LL, et al. Targeted and non-targeted metabolic time trajectory in plasma of patients after acute coronary syndrome. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 56: 343-51.

Metabolomics in ischaemic stroke, new diagnostic and prognostic biomarkers

Summary. The study of biomarkers related with ischaemic stroke is becoming increasingly more important as a way to further our knowledge of the pathophysiological changes that occur in cerebrovascular disease and to make it easier to reach an early diagnosis. Within this field, metabolomics offers a novel approach. The field is defined as the study of the small-molecule metabolites derived from cell metabolism. Its interest lies in the fact that, using a biological sample, it offers a snapshot of the cellular changes that are taking place. Today, the application of metabolomics requires a complex methodology that includes the application of laboratory separation techniques, multivariate statistical analyses and the use of bioinformatic tools. A number of studies conducted within the field of cardiovascular disease have focused on the application of this approach. In recent years there has been a steady growth in the number of publications referring to the metabolic changes related with ischaemic stroke, both in animal models and in patients. Metabolomics makes it possible to obtain the profiles of metabolites that identify patients who have suffered an ischaemic stroke. Furthermore, since studies have been carried out that relate certain metabolites with the most common causations of ischaemic stroke, metabolomics may eventually play a significant role in the study of cryptogenic stroke. The most exhaustive knowledge of the changes in the metabolic pathways involved in cerebrovascular disease could lay the foundations for the development of new neuroprotector strategies.

Key words. Biomarkers. Diagnosis. Ischaemic stroke. Metabolites. Metabolomics. Pathophysiology.