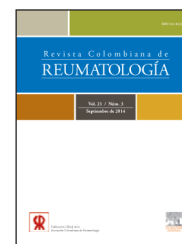


# Revista Colombiana de REUMATOLOGÍA

www.elsevier.es/rcreuma



## Investigación original

# Análisis proteómico del líquido cefalorraquídeo de pacientes con lupus neuropsiquiátrico, un abordaje inicial para la búsqueda de biomarcadores

Johanna Pedroza Díaz<sup>a,\*</sup>, Carlos Horacio Muñoz Vahos<sup>b,c</sup>, Tania Paola Luján Chavarría<sup>a</sup>, Gloria María Vásquez Duque<sup>a,c</sup> y Blanca Lucía Ortiz Reyes<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>b</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

<sup>c</sup>Grupo de Reumatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>d</sup>Universidad Autónoma de Madrid, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 3 de febrero de 2014

Aceptado el 24 de julio de 2014

### Palabras clave:

Biomarcadores

Proteómica

Líquido cefalorraquídeo

Lupus neuropsiquiátrico

## R E S U M E N

**Introducción:** El diagnóstico de lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (LES-NP) se basa en las características clínicas, utilizando la nomenclatura y descripción de caso del Colegio Americano de Reumatología 1999; sin embargo, la falta de especificidad de estos síndromes hacen difícil el diagnóstico.

**Objetivo:** Identificar moléculas en perfiles proteicos del líquido cefalorraquídeo de pacientes con LES-NP, con expresión diferencial, que podrían utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico.

**Metodología:** Se utilizaron 26 muestras de líquido cefalorraquídeo de 5 grupos, LES-NP y 4 grupos controles. Las herramientas utilizadas para la ejecución de este trabajo incluyeron electroforesis bidimensional para la obtención de perfiles proteicos, uso del *software* Image Master Platinum 2D para las comparaciones y el *software* Graphpad Prism versión 6.0 para el análisis estadístico.

**Resultados:** Análisis comparativos y estadísticos revelaron 3 spots con expresión diferencial, al comparar pacientes LES-NP con los otros grupos de estudio.

**Discusión:** Las técnicas utilizadas para la ejecución de este trabajo de investigación permitieron la identificación de un blanco de estudio para la búsqueda de biomarcadores en LES-NP, los cuales podrían ser utilizados como ayuda diagnóstica/pronóstica de la enfermedad.

© 2014 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.

Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joha27@gmail.com (J. Pedroza D.).

## Proteomic analysis of cerebrospinal fluid of neuropsychiatric patients: An initial approach to the search for biomarkers

A B S T R A C T

### Keywords:

Biomarkers

Proteomics

Cerebrospinal fluid

Neuropsychiatric lupus

**Introduction:** The diagnosis of neuropsychiatric lupus (NP-SLE) is based on clinical features using the nomenclature and description of case of the American College of Rheumatology, 1999. However, the lack of specificity of these syndromes makes the diagnosis difficult.

**Objective:** To identify molecules in CSF protein profiles of NP-SLE patients with differential expression, which could be used as biomarkers for diagnosis.

**Methodology:** A total of 26 CSF samples from five groups, one NP-SLE and four control groups were used. The tools used for the execution of this work included two-dimensional electrophoresis to obtain protein profiles, ImageMaster 2D Platinum software for comparative analysis, and statistical analysis using Graphpad Prism Version 6.0.

**Results:** Statistical analysis and comparison revealed three spots with differential expression when comparing SLE patients with NP-other study groups.

**Discussion:** The techniques used for the implementation of this proposed research allowed the identification of a line of study for finding biomarkers in neuropsychiatric lupus, which could be used as a diagnostic / prognostic disease support.

© 2014 Asociación Colombiana de Reumatología. Published by Elsevier España, S.L.

All rights reserved.

## Introducción

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad que puede afectar a todos los órganos, causando así, alteraciones cutáneas, musculoesqueléticas, cardiopulmonares, renales y neuropsiquiátricas (LES-NP), entre otras<sup>1</sup>. Estas últimas han sido ampliamente relacionadas con la morbilidad y la mortalidad y, por ende, dan cuenta de un pronóstico pobre<sup>1</sup>.

Para el diagnóstico y clasificación del LES-NP se utiliza la nomenclatura y descripción de caso dados por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, en inglés American College of Rheumatology) en 1999<sup>2</sup>; sin embargo, el diagnóstico de esta patología es difícil y ocasionalmente no se realiza de la manera correcta, esto debido a que el LES-NP presenta una etiopatogenia compleja, gran heterogeneidad de presentaciones clínicas, un curso impredecible y, por si fuera poco, las pruebas imaginológicas y de laboratorio realizadas no son contundentes. Finalmente, el diagnóstico dependerá del juicio clínico y de la exclusión de otras causas que puedan explicar los síntomas neurológicos como infección<sup>3</sup>, hipertensión arterial grave, alteraciones metabólicas o el tratamiento con esteroides, las cuales son capaces de causar las mismas manifestaciones NP, y no es raro que coexistan en pacientes con LES, lo que dificulta aún más el diagnóstico<sup>4</sup>.

Adicionalmente, en diversos estudios, se ha reportado cómo las manifestaciones NP son una de las principales causas de daño irreversible en este grupo de pacientes<sup>5-9</sup>. Por todas estas razones, nos planteamos como objetivo general del trabajo buscar biomarcadores proteicos que permitan hacer el diagnóstico más preciso de pacientes con LES-NP<sup>10</sup>.

Para la búsqueda de posibles biomarcadores, se ha hecho uso de áreas en el estudio de las "ómicas" como la genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica, entre otras. La proteómica ha sido un campo ampliamente investigado en las dos décadas pasadas y se define como el área encargada del estudio del conjunto de proteínas expresadas en un sistema, conocido como proteoma. Dicho proteoma puede ser detectado a partir de diferentes muestras biológicas (tejidos y fluidos corporales).

Para el estudio del proteoma presente en muestras biológicas de alta complejidad han sido implementadas diferentes técnicas, entre ellas, la electroforesis bidimensional (2D), la cual corresponde a una estrategia de separación de proteínas de alta resolución que se realiza en dos pasos; la primera dimensión, conocida como isoelectroenfoque, cuyo principio es la separación por punto isoelectro (PI) de dichas moléculas, y una segunda dimensión basada en la separación por peso molecular (MW) de las proteínas que se han de separar.

En LES-NP, el líquido cefalorraquídeo (LCR) es una buena fuente para el estudio de biomarcadores proteicos dado que este se encuentra directamente en contacto con parte del sistema nervioso central (SNC), y permite un intercambio de sustancias, ya que es donde se absorben compuestos bioquímicos útiles o se eliminan de manera selectiva los diferentes compuestos tóxicos para el SNC; además, dicho líquido facilita la regulación del SNC a través de la circulación de neuropéptidos y hormonas, por lo tanto, este fluido corporal refleja el estado bioquímico del sistema tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas. Por ello, puede ser considerado como una excelente fuente para la identificación de biomarcadores de enfermedades con manifestaciones neurológicas<sup>11</sup>.

Hasta la fecha, han sido reportadas diferentes proteínas presentes en el LCR cuya expresión puede ser usada como marcador biológico de la entidad, entre ellas autoanticuerpos antineuronales<sup>12-18</sup> y proteínas como ubiquitina e interleuquinas<sup>19-23</sup>.

En el presente estudio se detectaron moléculas proteicas con expresión diferencial en muestras de LCR de pacientes con LES-NP; esto fue realizado mediante la evaluación del proteoma del LCR de pacientes con dicha enfermedad, otras condiciones clínicas e individuos controles (IC), aprovechando la técnica de electroforesis bidimensional. Al realizar el análisis comparativo de los perfiles proteicos del LCR de pacientes con LES-NP y los otros grupos de estudio, se encontró la presencia de diferentes spots con expresión diferencial en las muestras de LCR de los pacientes, cuya futura identificación permitirá correlacionar las moléculas relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad, estableciendo con ello su posible utilidad como marcador biológico para LES-NP.

## Metodología

### Pacientes

Siendo este un estudio de tipo observacional, el tamaño de la muestra se determinó por conveniencia. Los pacientes fueron captados tanto de la consulta externa como del Servicio de Hospitalización del Hospital Universitario San Vicente Fundación y de la IPS Universitaria, Clínica León XIII; y cumplieron con los criterios de clasificación para LES del ACR<sup>24</sup>. El consentimiento informado fue obtenido de todos aquellos que voluntariamente desearon participar en el estudio, y en el caso de los pacientes con manifestaciones NP (lúpicas o por otras causas), el consentimiento informado fue firmado por un familiar o un acompañante cuando aquellos no estuvieron en capacidad de hacerlo. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de ambas instituciones.

Los grupos de estudio fueron conformados por mujeres adultas, no embarazadas: 5 con LES-NP, 6 con LES sin manifestaciones NP (cumpliendo los criterios de clasificación del ACR), 6 pacientes con manifestaciones NP no lúpicas (NPnoLES), 5 con otras enfermedades autoinmunes (OEA) y 4 IC.

Todos los pacientes del estudio tenían en su historia clínica los resultados de los exámenes de laboratorio básicos que caracterizaron mejor su estado clínico, el grado de actividad de la enfermedad, y corroboraron los criterios de clasificación del ACR para LES y LES-NP.

#### *Criterios de inclusión de manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas*

1. Diagnóstico de LES, cumpliendo 4 o más criterios de clasificación del ACR<sup>24,25</sup>. 2. Presencia de alguna de las manifestaciones NP definidas por la nomenclatura de LES-NP del ACR en 1999<sup>6</sup>. 3. Edad  $\geq 18$  años. 4. Consentimiento informado firmado por un familiar o acompañante y 2 testigos.

#### *Criterios de inclusión de lupus eritematoso sistémico*

1. Diagnóstico de LES, cumpliendo 4 o más criterios de clasificación del ACR<sup>24,25</sup>. 2. Ausencia de manifestaciones NP. 3. Edad  $\geq 18$  años. 4. Consentimiento informado firmado por el paciente y 2 testigos.

#### *Criterios de inclusión de pacientes con manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas*

1. Según criterios de la cuarta edición del *Manual de Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales*. Texto revisado (DSM-IV-TR), y enfermedades neurológicas no autoinmunes confirmadas por un especialista en psiquiatría o neurología. 2. Exclusión de causas secundarias de las manifestaciones NP: infecciosas, tóxicas, metabólicas, tumorales traumáticas y lúpicas. 3. Edad  $\geq 18$  años. 4. Consentimiento informado firmado por un familiar o acompañante y 2 testigos.

#### *Criterios de inclusión de pacientes con otras enfermedades autoinmunes*

1. Diagnóstico de otras enfermedades autoinmunes. 2. Edad  $\geq 18$  años. 3. Consentimiento informado firmado por el paciente y 2 testigos. 4. Ausencia de antecedentes de cualquier trastorno psíquico o neurológico según DSM-IV-TR.

#### *Criterios de inclusión de individuos control*

1. Exclusión del diagnóstico de LES y de otras enfermedades autoinmunes. 2. Ausencia de antecedentes de cualquier trastorno psíquico o neurológico según DSM-IV-TR. 3. Edad  $\geq 18$  años. 4. Consentimiento informado firmado por el individuo y 2 testigos.

#### *Laboratorios básicos y mediciones*

Los datos disponibles fueron tomados de la historia clínica de consulta externa o de hospitalización, lo más cercanamente posible a la fecha de la recolección de la muestra del LCR (aproximadamente 15 días). Se incluyeron los estudios hematológicos, serológicos, inmunológicos, bioquímicos y de LCR. Adicionalmente, se recopilaron los nombres de los medicamentos (específicamente inmunosupresores) que habían recibido los pacientes desde su diagnóstico, lo que se le llama en la descripción demográfica "tratamiento acumulativo".

Como índice de actividad para LES se utilizó el SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)<sup>26</sup>.

Se registraron los medicamentos utilizados (corticosteroides, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina, metotrexato, antiinflamatorios no esteroideos, ciclofosfamida, biológicos, antipsicóticos, antidepresivos, otros), el tiempo de evolución del lupus y la aparición de las manifestaciones NP. De manera análoga, se hizo para los pacientes con manifestaciones NP por otras causas.

#### *Obtención del líquido cefalorraquídeo*

Con el consentimiento informado diligenciado y firmado, como se describió anteriormente, el médico procedía a la toma de muestra para los análisis clínicos y entregaba una alícuota de 2 ml para los estudios de proteómica. Los 2 ml se dividían en alícuotas y se marcaban con el código correspondiente a cada paciente. Las alícuotas se guardaban a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Cabe anotar que durante el procedimiento de toma de muestra y almacenamiento, la muestra de LCR se encontraba en condiciones de esterilidad.

### Procesamiento del líquido cefalorraquídeo

La extracción de las proteínas presentes en la muestra de LCR se hizo mediante el método de precipitación con acetona; luego, la cuantificación de estas fue realizada utilizando la técnica del BCA (BCA-kit, BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific); posteriormente, se hicieron alícuotas de 20 µg de proteína, y por último, se corroboró la eficiencia de estos procedimientos y la integridad de las proteínas por medio de electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12% (1D, SDS-PAGE).

### Electroforesis bidimensional

Para la primera dimensión (PI), se resuspendieron 20 µg de proteínas en buffer de hidratación (7M/2M urea/tiourea, 4% CHAPS, 100 mM DTT y 1% de anfolitos pH 4-7/3-10). Luego, se rehidrató la tirilla de gradientes de pH inmovilizados IPG (IPG, en inglés *isoelectric point gel*); tirillas de 7 cm y rango pH 4-7, Invitrogen®). El corrido de la electroforesis de primera dimensión duró 1 h, 40 min, con aumento progresivo del voltaje, lo que permitió que se formara el gradiente de pH, de la siguiente manera: 200V-450V-600V-750V-950V durante 5 min, 1.200V-1.400V-1.600V por 10 min cada uno, y para finalizar, 2.000V durante 45 min (ZOOM® IPG Runner™, Invitrogen®). Después de finalizar la primera dimensión, se retiró la tirilla de IPG del soporte y se equilibró con el tampón de corrido (buffer LDS-Invitrogen®) más DTT. Para la segunda dimensión (MW), la tirilla se colocó en el gel preformado (4-12% poliacrilamida Bis-Tris, NuPAGE-gel, Invitrogen®) y se corrió a 200 voltios (XCell SureLok™, Invitrogen®) con buffer MES SDS 1X (Invitrogen®) por 45 min.

### Visualización de los spots en el gel

Para la visualización de las proteínas en geles de poliacrilamida, se utilizó la técnica de tinción con plata. Específicamente para el revelado e identificación de proteínas en los geles 2D, se utilizó plata compatible con espectrometría de masas (SilverQuest™ Staining Kit, Invitrogen®, Carlsbad-Estados Unidos). El protocolo usado fue el recomendado por el fabricante.

## Plan de análisis

### Análisis de electroforesis bidimensional y selección de los spots de interés

Inicialmente, se hizo un análisis por simple observación directa de los geles teñidos. Luego, las imágenes de los geles fueron obtenidas con el Image Scanner A3 10000XL (Epson) y se analizaron por medio del software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Con posterioridad, se realizó la detección de los puntos con una prominencia (*saliency*) de 300, y como punto de referencia (*landmark*) se definió un spot presente en todos los geles. Se ubicaron tanto los marcadores de MW como los puntos extremos del isoelectroenfoco (pH 4-7).

Se crearon 5 grupos (denominados clases para el software) con los 26 geles. De cada clase se seleccionó un gel referente con el cual se cotejaron los otros 4. Finalmente, con las clases definidas, se realizó el análisis interclases, obteniendo del software un listado de spots con su respectivo resultado estadístico (p, análisis de la varianza de una vía). Se seleccionaron aquellos puntos con  $p < 0,05$  y se revisaron uno por uno en la pantalla con el fin de seleccionar los que se consideraron que correspondían realmente a spots claramente definidos.

### Análisis estadístico

Se definió un análisis de varianza no paramétrico; a los datos de intensidad de los spots seleccionados se les evaluó la normalidad por medio del test de Shapiro-Wilk. Teniendo en cuenta estos resultados se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con valor  $p < 0,05$  para la significancia estadística, y se les realizó una corrección *post hoc* con la prueba de múltiples comparaciones de Dunn; con el software Graphpad Prism versión 6.0 (Graphpad Software, San Diego, California, EE.UU.).

## Resultados

### Descripción demográfica y clínica de individuos en el estudio

Los individuos participantes en el estudio fueron captados en las dos instituciones anteriormente mencionadas. La condición clínica de los individuos, así como sus características demográficas están resumidas en la tabla 1. Es de resaltar que el 100% de los individuos de los grupos LES-NP y LES son de sexo femenino, y que el 60% de las pacientes con LES-NP presentan psicosis. Los esquemas de tratamiento entre los grupos de pacientes con LES-NP, LES y OEA fueron similares.

### Extracción, cuantificación e integridad de proteínas

Los resultados de la cuantificación de proteínas extraídas de las muestras de LCR a través del método de ácido bicinónico presentaron que la concentración de estas se encuentra entre 0,3-5,0 µg/µl. La electroforesis 1-DE mostró bandas claramente definidas, indicando así que la manipulación de las muestras de LCR y la obtención de proteínas por dicho método no causó degradación de las moléculas (fig. 1).

### Separación de proteínas por electroforesis bidimensional y análisis comparativo

Los perfiles proteicos en las 2D mostraron buena resolución y reproducibilidad intraexperimental. Se muestra un gel representativo de los diferentes grupos de estudio; cada gel muestra el perfil proteico del LCR de un individuo, separado por electroforesis 2D; la separación de la primera dimensión se hizo en tirillas de 7 cm y PI (pH 4-7), y la segunda en geles preformados de 4-12% de poliacrilamida; asimismo, la tinción mostrada es plata compatible con masas (fig. 2).

**Tabla 1 – Características demográficas y clínicas de los individuos participantes en el estudio, se incluye: edad, manifestación neuropsiquiátrica, índice de actividad de la enfermedad, índice de daño, enfermedad autoinmune presente, motivo por el cual se le realiza la punción lumbar y tratamiento acumulativo según aplique**

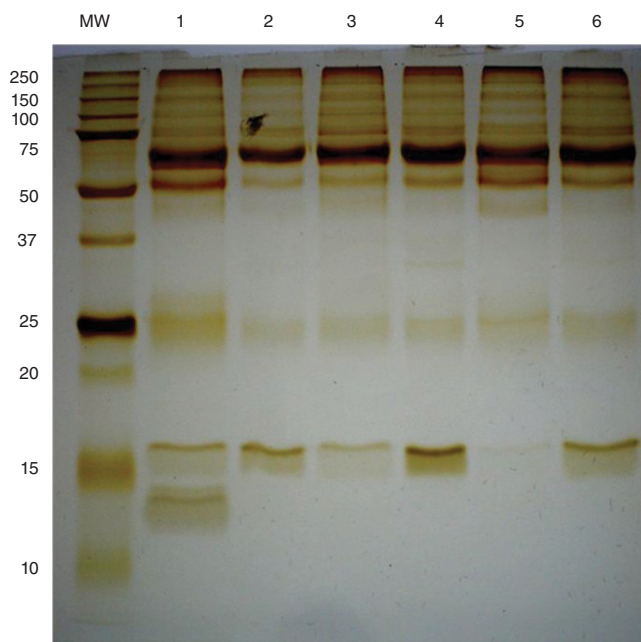
Condición clínica	Edad	Manifestación NP	SLEDAI	SLICC	Otra enfermedad autoinmune	Motivo punción IC	Tratamiento acumulativo
LES-NP	49	Estado confusional agudo	21	0	No	NA	Metilprednisolona
LES-NP	44	Psicosis	10	1	No	NA	Prednisolona, metilprednisolona, azatioprina, ciclofosfamida
LES-NP	30	Cefalea	18	0	No	NA	Prednisolona, metilprednisolona, cloroquina, micofenolato mofetilo, ciclofosfamida
LES-NP	36	Psicosis	16	0	No	NA	Prednisolona, metilprednisolona, cloroquina, micofenolato mofetilo, ciclofosfamida
LES-NP	52	Psicosis	16	3	No	NA	Ciclofosfamida, prednisolona, cloroquina
LES	20	No	2	0	No	NA	Prednisolona, metilprednisolona, cloroquina, ciclofosfamida
LES	46	No	2	4	No	NA	Prednisolona, cloroquina, ciclofosfamida
LES	31	No	5	4	No	NA	Prednisolona
LES	47	No	2	2	No	NA	Cloroquina
LES	19	No	19	0	No	NA	Prednisolona, metilprednisolona
LES	23	No	8	1	No	NA	Metilprednisolona, ciclofosfamida
NPnoLES	32	Cefalea	NA	NA	No	NA	Carbonato de calcio, calcitriol, clonidina, losartán, metoprolol, omeprazol, eritropoyetina
NPnoLES	37	Cefalea	NA	NA	No	NA	Ciclofosfamida, metilprednisolona, prednisolona
NPnoLES	17	Polineuritis inflamatoria	NA	NA	No	NA	Ciclofosfamida, metilprednisolona, prednisolona
NPnoLES	65	Neuropatía isquémica	NA	NA	No	NA	Verapamilo, losartán, hidroclorotiazida, atorvastatina
NPnoLES	47	Cefalea	NA	NA	No	NA	Enalapril, captopril, losartán, imipramina, dalteparina, hidrocortisona
NPnoLES	73	Cefalea	NA	NA	No	NA	Enalapril, atorvastatina, lansoprazol, captopril, fenitoina, clonidina, metoprolol
OEA	28	No	NA	NA	Sarcoidosis	NA	Prednisolona, metilprednisolona, metotrexato, infliximab
OEA	48	No	NA	NA	Neuritis óptica	NA	Metilprednisolona
OEA	26	No	NA	NA	Arteritis de Takayasu	NA	Prednisolona, metotrexato
OEA	27	No	NA	NA	SAF primario	NA	Ciclofosfamida, metilprednisolona
OEA	49	No	NA	NA	Neuritis óptica	NA	Prednisolona, azatioprina, metilprednisolona
IC	35	No	NA	NA	No	Hipertensión intracraneana idiopática	NA
IC	78	No	NA	NA	No	Síncope	NA
IC	45	No	NA	NA	No	Procedimiento quirúrgico	NA
IC	43	No	NA	NA	No	Procedimiento quirúrgico	NA

IC: individuos controles; LES: lupus eritematoso sistémico; LES-NP: lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico; NPnoLES: manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas; OEA: otras enfermedades autoinmunes; SLEDAI: índice de actividad de la enfermedad; SLICC: índice de daño.

Los análisis comparativos fueron realizados utilizando el software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), los parámetros de análisis fueron los siguientes: valor de prominencia (*saliency*) 300, *smooth* 2 y área mínima 5, y fue tenido en cuenta un punto de referencia (*landmark*), cuya ubicación en el gel corresponde a un MW aproximado de 15 kDa y un PI de 5,5. Al realizar los análisis entre los diferentes grupos, se encontraron 3 *spots* con expresión diferencial en términos

de aumento/disminución (números: 16, 19 y 68). Se presenta una gráfica 3D de uno de los *spots* cuya expresión diferencial fue determinada a través de los análisis comparativos realizados con el software Image Master (fig. 3).

Los datos de intensidad (unidades de intensidad) y los resultados obtenidos a partir de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn aplicadas se muestran en la figura 4. Las pruebas estadísticas revelan diferencias significativas al com-



**Figura 1 – Evaluación de integridad de proteínas extraídas: gel SDS PAGE al 12%. Peso molecular: marcador de peso molecular; carril 1: lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico; carril 2-3: lupus eritematoso sistémico; carril 4: manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas; carril 5: otras enfermedades autoinmunes, y carril 6: individuos controles. Las proteínas se visualizaron mediante tinción de plata, tiempo de revelado de 2 minutos.**

parar el grupo de estudio, LES-NP, con los grupos controles. La prueba de comparaciones múltiples permite determinar diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), al comparar LES-NP vs. NPnoLES en los spots 16 y 19, y LES-NP vs. LES en el spot 68.

Tanto los spots de interés como el punto de referencia en el gel 2D son señalados en la figura 5.

## Discusión

Múltiples estudios han evaluado posibles marcadores biológicos para el diagnóstico, actividad y recidivas del LES-NP; sin embargo, existen diversas falencias, tales como: la presencia de estas proteínas en las muestras biológicas de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y enfermedades NP no lúpicas, hallazgos contradictorios que muestran variabilidad en los niveles durante el desarrollo del LES o durante la presencia de las manifestaciones NP, es decir, expresión variable en el tiempo; y además, el comportamiento de la enfermedad es diferente entre individuos, es decir, variación interindividual. Todo esto ha hecho difícil establecer una proteína como biomarcador para LES-NP<sup>15,17,20,22,27,28</sup>.

Dentro de las técnicas de proteómica utilizadas para la obtención de estos resultados se tuvieron herramientas de separación de proteínas como geles de poliacrilamida de 1D y 2D; la electroforesis 2D permite la obtención de perfiles

proteicos a partir de un proteoma específico, como en nuestro caso en muestras de LCR de pacientes con LES-NP. Es de resaltar la versatilidad de esta técnica, dado que permite una amplia variedad de aplicaciones, entre ellas la detección de modificaciones postraduccionales.

Una de estas modificaciones es la metilación; específicamente en lupus se ha demostrado que no solo juega un papel en la vía de activación del receptor clonotípico de las células T, sino que actúa también sobre otros receptores ampliamente involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, como en el receptor de célula B y los receptores tipo Toll presentes en células presentadoras de antígenos.

Otras modificaciones postraduccionales han sido ampliamente correlacionadas con la fisiopatología del lupus, entre ellas la fosforilación de algunas proteínas como ERK 1, ERK 2 y otras proteínas involucradas en la vía de señalización de las MAP quinasas.

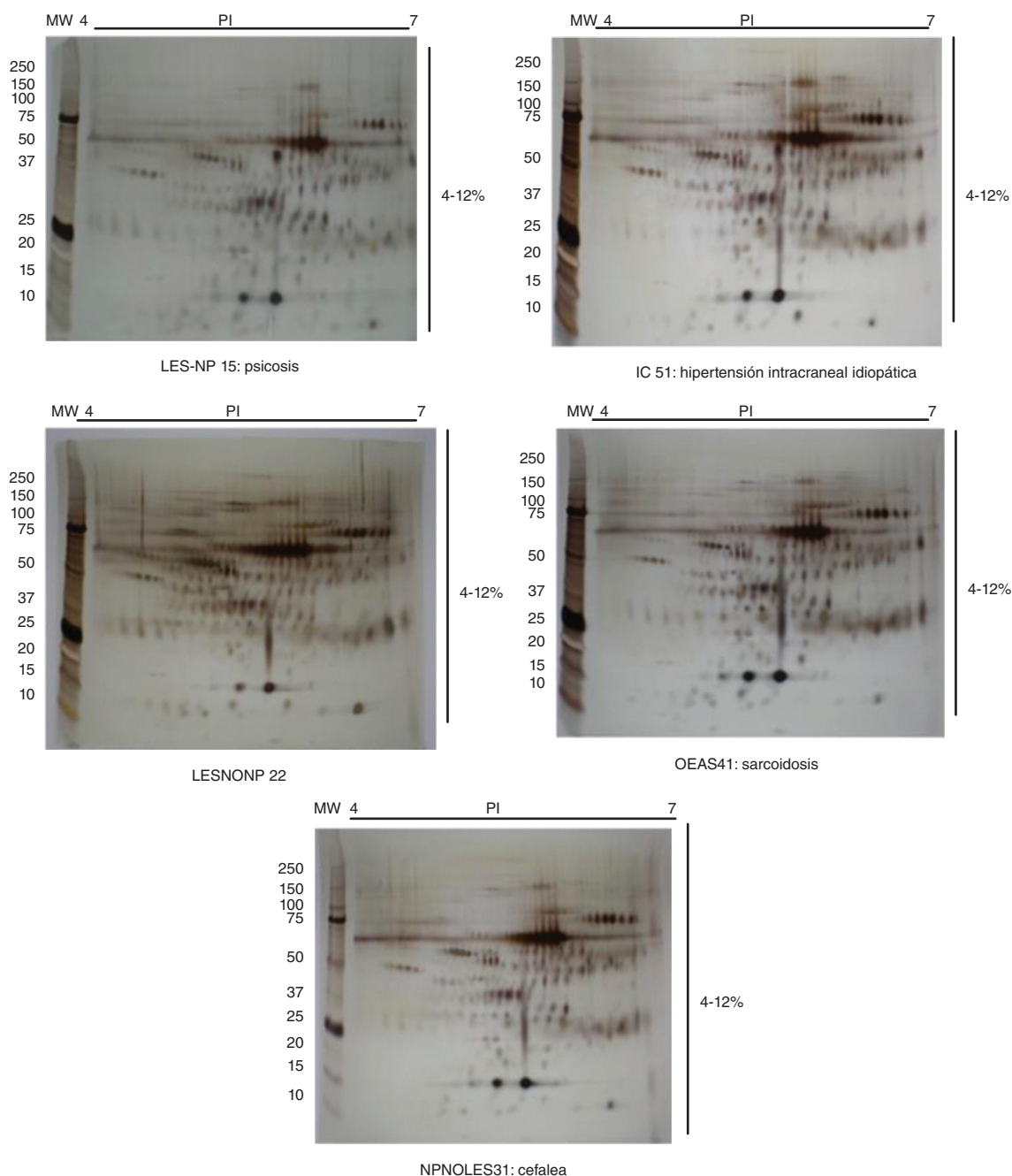
Las modificaciones postraduccionales alteran notablemente el proteoma, no solo en términos estructurales, sino en términos de actividad. Esta ganancia o pérdida de actividad puede influir en la fisiopatología de la enfermedad autoinmune, de ahí que puede ser de gran utilidad la identificación de proteínas con modificaciones postraduccionales que tengan un papel en el LES-NP y que, por lo tanto, puedan constituir posibles biomarcadores para la enfermedad.

La electroforesis 2D no solo permite identificar dichas modificaciones, sino que de manera más frecuente con esta técnica se pueden determinar cambios en un proteoma en términos de aumento/disminución o presencia/ausencia en la expresión de una proteína, lo que favorece la búsqueda de biomarcadores por medio de esta estrategia.

Aunque, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica han sido realizadas diferentes modificaciones, entre ellas la depleción de proteínas de expresión abundante como la albumina y las inmunoglobulinas, con el fin de visualizar mejor el perfil proteico correspondiente a proteínas de baja abundancia<sup>29,30</sup>, esta modificación ha sido ampliamente realizada en muestras de suero de individuos con diferentes condiciones clínicas. En el caso particular del proteoma de LCR no es posible realizarle este ajuste a la técnica ya que la concentración de proteínas extraídas a partir de esta muestra es relativamente baja, debido a que el volumen recolectado en muchas ocasiones es  $\leq 500 \mu\text{L}$ ; esto puede constituir una dificultad adicional en la búsqueda de biomarcadores a partir de esta muestra biológica.

Aunque la técnica ha demostrado ser muy versátil, algunos autores discuten las limitaciones de esta, entre las que enumeran: la resolución, reproducibilidad, detección de proteínas de baja abundancia y de proteínas integrales de membrana.

Sin embargo, diferentes modificaciones han permitido el mejoramiento de la técnica, en concreto la resolución fue dramáticamente mejorada por O'Farrell en 1975<sup>31</sup>, quien introdujo el uso de agentes caotrópicos y detergentes para la solubilización de la muestra previa a las separaciones de primera y segunda dimensión. Posteriormente, Gasparic et al. desarrollaron los IPG. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas "inmobilinas", las cuales están copolimerizadas con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema

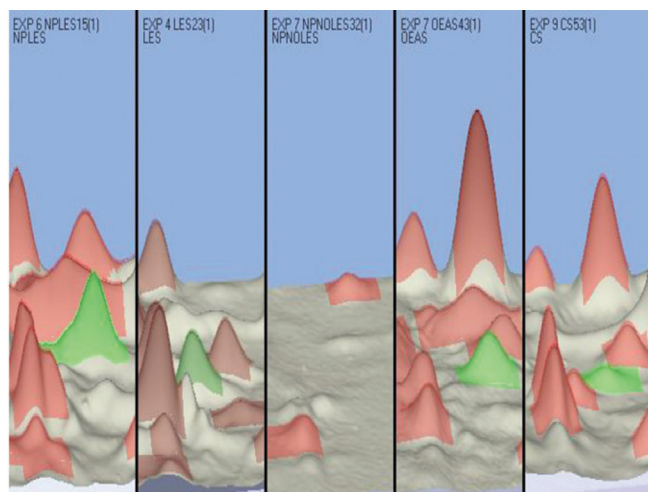


**Figura 2 – Geles bidimensionales, gel de poliacrilamida SDS-PAGE representativo de cada grupo de estudio: lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico, lupus eritematoso sistémico, manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas, otras enfermedades autoinmunes e individuos controles. Primera dimensión: tirilla de 7 cm y punto isoelectrico 4-7, y segunda dimensión: poliacrilamida de 4-12%, tinción de plata compatible con masas, tiempo de revelado de 6 minutos. El protocolo de corrido corresponde al descrito previamente en metodología.**

ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles, así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada.

Las modificaciones realizadas con la técnica de 2D y el uso de la tinción de plata compatible con masas permitieron mejorar la sensibilidad del método y obtener así los perfiles proteicos de las muestras de LCR de los pacientes con LES-NP

y de los IC (LES, NPnoLES, OEA e IC), los cuales fueron comparados con el software Image Master Platinum 7.0 de General Electric, con el fin de determinar proteínas con expresión diferencial. Como resultado se lograron definir 4 spots con expresión aumentada en el LCR de pacientes con LES-NP; estos spots, conocidos en los resultados como 16, 19 y 68, presentan un PI entre 5-6 y un MW de entre 20-25 kDa en los



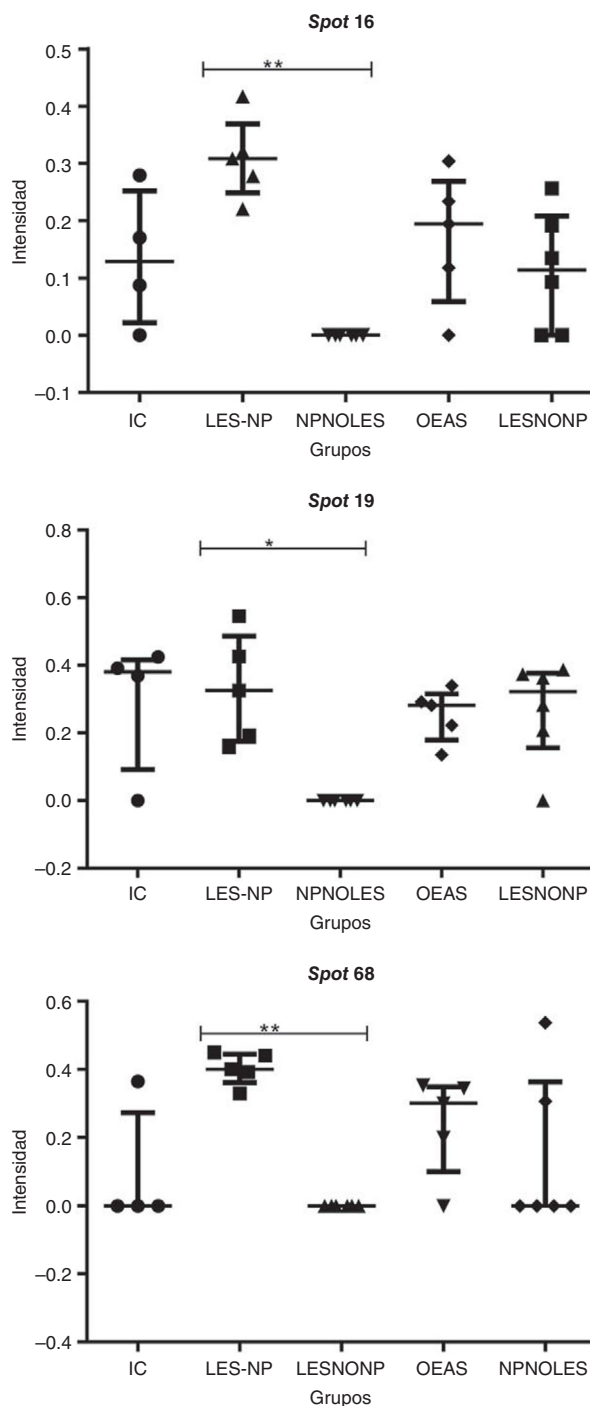
**Figura 3 – Imagen 3D del spot 16:** gráfica obtenida del software Image master platinum 7.0. Se presenta el spot 16 (pico verde) cuya expresión diferencial aumentada es evidente en pacientes con lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (primera columna de izquierda a derecha) al ser comparada con los grupos controles, en el orden, lupus eritematoso sistémico, manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas, otras enfermedades autoinmunes e individuos controles, 4 columnas siguientes de izquierda a derecha, en las cuales el pico verde resulta de menor tamaño, o incluso en el grupo de pacientes con manifestaciones neuropsiquiátricas no lúpicas, en el que no se encuentra expresión detectable. Los picos observados en rosa corresponden a otros spots que no fueron de interés.

2 primeros, y de aproximadamente 59 KDa en el spot 68. Para su posterior identificación, se requieren estudios de proteómica como los de espectrometría de masas.

Diferentes autores han establecido que la búsqueda de marcadores biológicos corresponde a un procedimiento sistemático que consta de cinco fases: estudios preclínicos exploratorios, caracterización clínica, ensayos de validación, asociación clínica (estudios retrospectivos), asociación clínica (estudios prospectivos) y control de la enfermedad; teniendo en cuenta las etapas propuestas por los autores, es necesario mencionar que esto corresponde a un estudio preliminar cuyo objetivo principal fue la estandarización de la técnica de electroforesis 2D para establecer la presencia de blancos proteicos dentro de los cuales puedan ser identificadas moléculas con función de biomarcador en pacientes con LES-NP<sup>32</sup>.

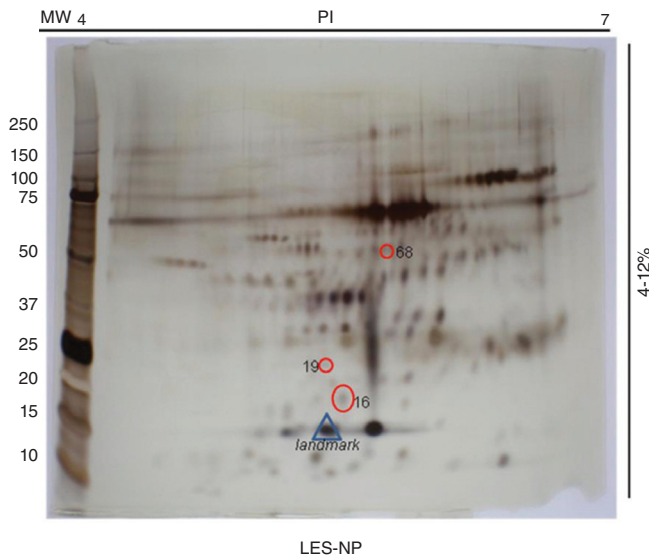
## Conclusiones y perspectivas

La electroforesis 2D permitió establecer la diferencia en los perfiles proteicos de los cinco grupos de individuos estudiados, y la posible expresión diferencial de tres proteínas en el grupo de los pacientes con LES-NP. Hallazgo que debe confirmarse con un mayor número de individuos. Adicionalmente, permite generar como perspectivas del trabajo abundar sobre



**Figura 4 – Valores de intensidad de los spots de interés por individuo en cada grupo de estudio. Los resultados muestran la mediana y el rango intercuartílico; las comparaciones entre grupos se hicieron con la prueba de Kruskal-Wallis, y como estadígrafo de contraste se utilizó la prueba de Dunn.**

la identificación de las proteínas correspondientes a los spots y la validación de los resultados actuales, con técnicas como espectrometría de masas para su identificación e inmunoensayos para su validación.



**Figura 5 – Spots seleccionados del perfil proteico de pacientes con lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico. Gel SDS-PAGE 4-12% de poliacrilamida. El triángulo azul corresponde al punto de referencia (landmark) usado para el análisis comparativo; en círculos rojos se observan los spots con expresión diferencial en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico comparados con los otros grupos de estudio.**

### Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

### Financiación

Agradecemos a la Asociación Colombiana de Reumatología la financiación recibida en la “convocatoria para la presentación de proyectos de investigación de la Asociación Colombiana de Reumatología” en el año 2011. Así mismo, agradecemos al programa de sostenibilidad de la Universidad de Antioquia, CODI, 2013-2014.

Además, agradecemos al Grupo de investigación en Inmunología Celular e Inmunogenética y al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales por la financiación dada

para la ejecución del proyecto y el uso de la herramienta de análisis de imágenes “Image Master Platinum 7.0”, respectivamente.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Agradecemos a las instituciones IPS Universitaria Clínica León XIII, al Hospital Universitario San Vicente Fundación y a los pacientes participantes que nos permitieron realizar la toma de muestras en dichas instituciones.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Kwieciński J, Kłak M, Trysberg E, Blennow K, Tarkowski A, Jin T. Relationship between elevated cerebrospinal fluid levels of plasminogen activator inhibitor 1 and neuronal destruction in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2094-101. Publicación electrónica 1 de Jul de 2009.
2. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.* 1999;42:599-608. Publicación electrónica 22 de Abr de 1999.
3. Bertsias GK, Ioannidis JP, Aringer M, Bollen E, Bombardieri S, Bruce IN, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:2074-82. Publicación electrónica 21 de Ago de 2010.
4. Hanly JG, McCurdy G, Fougere L, Douglas JA, Thompson K. Neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus: attribution and clinical significance. *J Rheumatol.* 2004;31:2156-62. Publicación electrónica 2 de Nov de 2004.
5. Frago-so-Loyo HE, Sánchez-Guerrero J. Effect of severe neuropsychiatric manifestations on short-term damage in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007;34(1):76-80. Publicación electrónica 5 de Dic de 2006.
6. Jönsen A, Bengtsson AA, Nived O, Ryberg B, Sturfelt G. Outcome of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus within a defined Swedish population: increased morbidity but low mortality. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:1308-12. Publicación electrónica 8 de Nov de 2002.
7. Karassa FB, Ioannidis JP, Boki KA, Touloumi G, Argyropoulou MI, Strigaris KA, et al. Predictors of clinical outcome and radiologic progression in patients with neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2000;109:628-34. Publicación electrónica 2 de Dic de 2000.
8. Mikdashi J, Handwerker B. Predictors of neuropsychiatric damage in systemic lupus erythematosus: data from the Maryland lupus cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:1555-60. Publicación electrónica 3 de Sep de 2004.

9. Sibley JT, Olszynski WP, Decoteau WE, Sundaram MB. The incidence and prognosis of central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1992;19:47-52. Publicación electrónica 1 de Ene de 1992.
10. Liu CC, Ahearn JM. The search for lupus biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2009;23:507-23. Publicación electrónica 14 de Jul de 2009.
11. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol.* 2012;259:1530-45. Publicación electrónica 27 de Ene de 2012.
12. Colasanti T, Delunardo F, Margutti P, Vacirca D, Piro E, Siracusano A, et al. Autoantibodies involved in neuropsychiatric manifestations associated with systemic lupus erythematosus. *J Neuroimmunol.* 2009;212:3-9. Publicación electrónica 9 de Jun de 2009.
13. Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;36:297-315. Publicación electrónica 30 de Ene de 2007.
14. Tin SK, Xu Q, Thumboo J, Lee LY, Tse C, Fong KY. Novel brain reactive autoantibodies: prevalence in systemic lupus erythematosus and association with psychoses and seizures. *J Neuroimmunol.* 2005;169:153-60. Publicación electrónica 9 de Sep de 2005.
15. Frago-so-Loyo H, Cabiedes J, Orozco-Narváez A, Dávila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y, Diamond B, et al. Serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with neuropsychiatric lupus erythematosus. Implications for diagnosis and pathogenesis. *PLoS One.* 2008;3:e3347. Publicación electrónica 7 de Oct de 2008.
16. Labrador-Horrillo M, Martínez-Valle F, Gallardo E, Rojas-García R, Ordi-Ros J, Vilardell M. Anti-ganglioside antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and neurological manifestations. *Lupus.* 2012;21:611-5. Publicación electrónica 11 de Feb de 2012.
17. Williams RC Jr, Sugiura K, Tan EM. Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1239-47.
18. Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, et al. Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *J Autoimmun.* 2009;32:79-84. Publicación electrónica 28 de Gen de 2009.
19. Okamoto H, Kobayashi A, Yamanaka H. Cytokines and chemokines in neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:268436. Publicación electrónica 10 de Jul de 2010.
20. Sun L, Chen H, Hu C, Wang P, Li Y, Xie J, et al. Identify biomarkers of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with weak cation magnetic beads. *J Rheumatol.* 2011;38:454-61. Publicación electrónica 18 de Ene de 2011.
21. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.* 1995;37:417-29. Publicación electrónica 1 de Ene de 1995.
22. Yang XY, Lin J, Lu XY, Zhao XY. Expression of S100B protein levels in serum and cerebrospinal fluid with different forms of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008;27:353-7. Publicación electrónica 24 de Oct de 2007.
23. Akenami FO, Koskiniemi M, Färkkilä M, Vaheri A. Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease. *J Clin Pathol.* 1997;50:157-60. Publicación electrónica 1 de Feb de 1997.
24. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7. Publicación electrónica 1 de Nov de 1982.
25. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
26. Gladman DD, Ibáñez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29:288-91. Publicación electrónica 13 de Feb de 2002.
27. Karassa FB, Afeltra A, Ambrozic A, Chang DM, De Keyser F, Doria A, et al. Accuracy of anti-ribosomal P protein antibody testing for the diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:312-24. Publicación electrónica 31 de Dic de 2005.
28. Lai NS, Lan JL. Evaluation of cerebrospinal anticardiolipin antibodies in lupus patients with neuropsychiatric manifestations. *Lupus.* 2000;9:353-7. Publicación electrónica 6 de Jul de 2000.
29. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:1096-103. Publicación electrónica 15 de Ago de 2003.
30. Bellei E, Bergamini S, Monari E, Fantoni LI, Cuoghi A, Ozben T, et al. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. *Amino acids.* 2011;40:145-56. Publicación electrónica 25 de May de 2010.
31. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250:4007-21. Publicación electrónica 25 de May de 1975.
32. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006;113:2335-62. Publicación electrónica 17 de May de 2006.