

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
Escuela Nacional de Salud Pública de México

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA
DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS PERFILES DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL
PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS CON *Helicobacter pylori* CON
DIAGNÓSTICO DE GASTRITIS CRÓNICA Y ADENOCARCINOMA GÁSTRICO
TIPO INTESTINAL.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

IBQ. Georgina Rojas Herrera

Director de Tesis:

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Asesores:

Dra. Julieta Ivone Castro Romero

Dr. Sergio M. Encarnación Guevara

RESUMEN

Antecedentes: El adenocarcinoma gástrico (ACG) constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer en nuestro país, por lo que continúa siendo un grave problema salud pública. Desde el punto de vista histológico y epidemiológico, el ACG ha sido clasificado en dos tipos principales: intestinal y difuso. La evolución de los tumores intestinales se ha caracterizado por una serie de lesiones que inician con la gastritis inducida por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) que puede evolucionar a gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal (MI), displasia, que culmina con la transformación de la mucosa gástrica y el desarrollo de cáncer. Varios estudios han demostrado que durante el proceso de transformación, la mucosa gástrica puede presentar alteraciones en diversos genes, que codifican para una gran variedad de proteínas con diferentes actividades dentro de la célula y las cuales podrían estar implicadas en el proceso de carcinogénesis y estos cambios pudieran verse reflejados en las proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Actualmente existe un número limitado de biomarcadores para la detección y la evaluación pronóstica del ACG. Entre ellos se encuentran los antígenos CA 72.4, CEA y CA19.9. Sin embargo, su sensibilidad y especificidad bajas no permiten recomendarlos como pruebas diagnósticas para el ACG. Por tal motivo, la identificación de nuevas moléculas en plasma con herramientas como la proteómica podrá ampliar la gama de moléculas que potencialmente puedan ser utilizados para la detección en forma temprana de cáncer gástrico y el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico no invasivas. **Objetivo:** Investigar los perfiles de proteínas presentes en plasma de pacientes infectados con *H. pylori* y diagnosticados con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal. **Metodología:** las muestras de plasmas a analizar serán de pacientes positivos a *H. pylori*, con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Se analizarán los perfiles de proteínas de ambos grupos por medio de la técnica electroforesis en geles diferenciales (2-DIGE). Las diferencias en los patrones de expresión de proteínas entre los grupos se analizarán y se seleccionaran los spots de las proteínas diferencialmente expresadas y se identificarán por espectrometría de masas.

Palabras Clave: Adenocarcinoma Gástrico (ACG), Metaplasia Intestinal (MI), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), Electroforesis en geles diferenciales en 2D (2D-DIGE), Isoelectroenfoque (IEF)

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO O CONCEPTUAL	3
2.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE H. PYLORI Y SU ASOCIACIÓN CON EL CÁNCER GÁSTRICO	3
2.1.1 CAGA	3
2.1.2 VACA.....	4
2.2 MODELO CARCINOGENICO.....	5
2.3 H. PYLORI Y LA INFLAMACIÓN.....	5
2.4 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE TIPO INTESTINAL.....	6
2.5 HISTORIA NATURAL DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	7
2.6 GASTRITIS CRÓNICA	7
2.7 ANTÍGENOS USADOS COMO MARCADORES TUMORALES.....	8
2.8 PROTEÓMICA	11
2.8.1 PROTEOMA DEL PLASMA SANGUÍNEO.....	12
3. MAPA CONCEPTUAL.....	13
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. HIPOTESIS	16
6. OBJETIVOS	16
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
6.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	17
7.2 DEFINICIÓN Y SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	17
7.2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	17
7.2.2 SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	17
7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	17
7.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	17
7.5 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO	18
7.6 FORMACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	18
7.7 MÉTODOS EXPERIMENTALES	18
7.7.1 TOMA Y MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	18
7.7.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE PLASMA PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO	20
7.7.4 AJUSTE DE pH DE LA MUESTRA DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	21
7.7.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	21
7.7.6 AJUSTE DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	22
7.7.7 GEL DE INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS DE PLASMA.	22
7.7.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS 2D.....	23
7.7.9 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA 2D-DIGE	24
7.7.10 PRIMERA DIMENSIÓN O ISOELECTROENFOQUE IEF	26
7.7.11 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SEGUNDA DIMENSIÓN	28
7.7.12 OBTENCIÓN DE LA IMAGEN	29
8. RESULTADOS	30

8.1 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE GASTRITIS CRÓNICA O ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	30
8.2 POSITIVIDAD A H. PYLORI.....	31
8.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	32
8.4. INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS.....	32
8.5 ELECTROFORESIS 2D.....	33
8.5.1 RESULTADOS PRELIMINARES.....	33
8.6 2D- DIGE.....	35
8.6.1 RESULTADOS PRELIMINARES.....	35
8.6.2 RESULTADOS FINALES.....	38
9. DISCUSIÓN.....	40
10. CONCLUSIONES.....	46
11. PERSPECTIVAS.....	47
12. REFERENCIAS.....	48
13. APENDICE DE RECTIVOS Y EQUIPO.....	58

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL PARA EL MARCAJE DE PROTEÍNAS PARA 2D-DIGE. P029, P035, P045 MUESTRAS DE PROTEÍNAS DE PACIENTES CASO (ACGI). P050, P044, P056 MUESTRAS DE PROTEÍNAS DE PACIENTES CONTROL (GC). VT ES EL VOLUMEN TOTAL, QUE SE OBTUVO AL MEZCLAR CADA MUESTRA MARCADA CON CADA CYDYE. BR ES EL BUFFER DE REHIDRATACIÓN A PH 8.5.	27
TABLA 2. PROTOCOLO PARA LA SEPARACIÓN POR PUNTO ISOELÉCTRICO IEF	28
TABLA 3. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO	30
TABLA 4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS DE PLASMA INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO	32

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MAPA CONCEPTUAL	14
FIGURA 2. PACIENTES POSITIVOS A <i>H. PYLORI</i> DIAGNOSTICADOS MEDIANTE WESTERN BLOT. EN LA PRIMERA Y SEGUNDA COLUMNA SE MUESTRAN LA TIRA DIAGNOSTICA DE LOS CONTROLES POSITIVO (C⁺) Y NEGATIVO (C⁻) RESPECTIVAMENTE. DE LA TERCERA A LA DÉCIMA COLUMNA SE MUESTRAN LAS TIRAS DIAGNOSTICAS DE LOS PACIENTES CON FOLIO P029, P034, P035, P044, P045, P050, P056, P059 RESPECTIVAMENTE.	31
FIGURA 3. GEL DE INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE PLASMA PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO. PM, MARCADOR DE PESO MOLECULAR; BSA, ALBUMINA SÉRICA BOVINA (10 µg) UTILIZADA COMO UN ESTÁNDAR; P029, P034, P035, P044, P045, P050, P056, P059, CORRESPONDE A LAS MUESTRAS DE PLASMA (10 µg). EL PROCEDIMIENTO SE REALIZÓ COMO SE INDICA EN MATERIALES Y MÉTODOS.	33
FIGURA 4. PROTEÍNAS DEL PLASMA 045 SEPARADAS, SIGUIENDO EL PROTOCOLO FINAL DE IEF (50 µg DE PROTEÍNA) Y EN LA ELECTROFORESIS 2D EN GEL DE ACRILAMIDA AL 12.5%.	34
FIGURA 5. PROTEÍNAS DEL PLASMA 045 SEPARADAS SIGUIENDO EL PROTOCOLO FINAL DE IEF (50 µg DE PROTEÍNA) Y LA ELECTROFORESIS 2D EN GEL CON GRADIENTE DE ACRILAMIDA 4-20 % (BIORAD 456-1091).	35
FIGURA 6. PERFIL DE PROTEÍNAS DE PLASMA P035 Y P045 SEPARADOS CON 2D-DIGE. A) IMAGEN DE ESTÁNDAR INTERNO MARCADO CON CY2. B) IMAGEN DEL PLASMA P035, MARCADO CON CY3. C) IMAGEN DEL PLASMA P045 MARCADO CON CY5. D) IMAGEN EMPALMADA DE LOS 3 GELES, TEÑIDOS CON CYDYE.	36
FIGURA 7. PERFIL DE PROTEÍNAS DE PLASMA P044 Y P035 SEPARADOS CON 2D-DIGE. A) IMAGEN DE ESTÁNDAR INTERNO MARCADO CON CY2. B) IMAGEN DEL PLASMA P044, MARCADO CON CY3. C) IMAGEN DEL PLASMA P035 MARCADO CON CY5. D) IMAGEN EMPALMADA DE LOS 3 GELES, TEÑIDOS CON CYDYE.	37
FIGURA 8. PERFIL DE PROTEÍNAS DE PLASMA P056 Y P029 SEPARADOS CON 2D-DIGE. A) IMAGEN DE ESTÁNDAR INTERNO MARCADO CON CY2. B) IMAGEN DEL PLASMA P056 CON DIAGNÓSTICO DE ADGI, MARCADO CON CY3. C) IMAGEN DEL PLASMA P029 CON DIAGNÓSTICO DE GC, MARCADO CON CY5. D) IMAGEN EMPALMADA DE LOS 3 GELES. GELES CON GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DE 4-20% DE ACRILAMIDA, 7CM, PH 3-10.	38
FIGURA 9. PERFIL DE PROTEÍNAS DE PLASMA P045 Y P050 SEPARADOS CON 2D-DIGE. A) IMAGEN DE ESTÁNDAR INTERNO MARCADO CON CY2. B) IMAGEN DEL PLASMA P045 CON DIAGNÓSTICO DE GC, MARCADO CON CY3. C) IMAGEN DEL PLASMA P050 CON DIAGNÓSTICO DE ACGI, MARCADO CON CY5. D) IMAGEN EMPALMADA DE LOS 3 GELES. GELES CON GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DE 4-20% DE ACRILAMIDA, 7CM, PH 3-10.	39

ABREVIATURAS

2D- DIGE	
Electroforesis en geles diferenciales en doble dimension.	22
ACG	
Adenocarcinoma Gástrico	2, 1
ACGI	
Adenocarcinoma Gástrico de tipo Intestinal.....	2
ADN	
Ácido Desoxirribonucleico	3
APC	
Gen supresor tumora (Adenomatous polyposis coli).....	7
BabA	
Adhesina de unión a antígenos de grupos sanguíneos	1
BSA	
Albumina Sérica Bovina.....	24
CA19.9	
Antígeno Carbohidrato 19.9.....	3
CA72.4	
Antígeno Carbohidrato 72.4.....	3
CagA	
Citotóxina Asociada a un gen A.....	2
CDX1	
Factor de transcripción específico de intestino 1	8
CDX2	
Factor de Transcripción específico de intestino 2.....	8
CEA	
Antígeno Carcinoembrionario.....	2
CyDye	
Fluoróforo	25
DCC	
Gen eliminado en Carcinoma Colorrectal	7
DMF	
Dimetilformamida	26
DTT	
Ditiotreitol.....	27
ELISA	
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	11
GA	
Gastritis Atrófica	2
GC	
Gastritis Crónica	2
<i>H. pylori</i>	
Helicobacter pylori	1
<i>hMLH1</i>	
Gen humano que se está situado en el brazo corto del cromosoma 3.....	7
<i>hMSH2</i>	
Gen humano que se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 2.....	7
<i>hPMS1</i>	
Gen humano de segregación postmeiotica 1.....	7
<i>hPMS2</i>	
Gen humano de segregación postmeiotica 2.....	7

HP-NAP	
Proteína Acarreadora de Neutrófilos de Helicobacter pylori	1
IEF	
Isoelectroenfoque	22
IFN- γ	
Interferón gama	8
MI	
Metaplasia Intestinal.....	2
MIF	
Factor inhibidor de la migración de macrófagos	11
<i>myc</i>	
Protooncogen <i>myc</i>	7
NF- κ B	
Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	6
OipA	
Proteína Inflamatoria de Membrana Externa	1
OMP's	
Proteínas de Membrana Externa	1
<i>p53</i>	
Gen Supresor tumoral <i>p53</i>	7
PMNs	
Polimorfonucleares	6
<i>ras</i>	
Gen <i>ras</i>	7
RNOS	
Especies Reactivas de Nitrógeno	5
ROS	
Especies Reactivas de Oxígeno	5
SabA	
Adhesina de Unión a Ácido Siálico	1
SDS	
Dodecilsulfato Sódico.....	24
TNF- α	
Factor de necrosis tumoral	8
uPAR	
Receptor para el activador de plasminógeno uroquinasa	6
VacA	
Citotóxina Vacuolizante	2
ZO-1	
Zona Ocludente	4

1. INTRODUCCIÓN

El ACG es una enfermedad compleja y heterogénea producida por la interacción entre factores infecciosos, genéticos y ambientales.

En 2008 el cáncer gástrico representó el cuarto cáncer más común a nivel mundial con 988,602 casos (7.8%), estimándose como el segundo lugar en mortalidad por cáncer con 737,419 defunciones (9.7%). La incidencia de cáncer gástrico es mayor en países en vías de desarrollo en comparación con los países desarrollados¹. En México, en el año 2008 el cáncer gástrico representó la segunda causa de muerte por tumor maligno con 6751 defunciones (8.7%) y el quinto lugar en incidencia con 7859 casos (6.2%)¹. Además que representa la tercera causa de muerte por cáncer en edad productiva. De igual manera, el cáncer gástrico y la úlcera péptica se encuentra dentro de las principales causas de mortalidad en personas mayores de 65 años, con tasas de mortalidad de 55.6 y 39.3 por cada 100 000 habitantes, respectivamente².

H. pylori es una bacteria Gram-negativa especializada en la colonización del epitelio gástrico³ y presenta factores de virulencia que favorecen la colonización de la mucosa gástrica, como es la producción de ureasa que le permite la supervivencia en condiciones ácidas⁴. Además su forma en espiral y la presencia de flagelos le permiten desplazarse a través del moco gástrico. La adherencia de *H. pylori* al epitelio gástrico se facilita por la presencia de OMP's como: SabA, BabA, OipA⁵. *H. pylori* también produce otros factores que le permiten sobrevivir en el estómago, como HP-NAP, que promueve la adhesión de neutrófilos humanos a las células endoteliales y la producción de radicales de oxígeno reactivo, lo que indica que HP-NAP actúa como una quimiocina, produciendo un estado de inflamación media a moderada³. Los factores de virulencia más importantes, asociados a la patogénesis de la bacteria son: VacA, la isla de patogenicidad (*cagPAI*), que contienen varios genes que codifican para las proteínas que forman un sistema de secreción tipo IV (T4SS) y para la citotoxina CagA la cual ha sido usada como un marcador para la isla *cagPAI*. Las cepas de

H. pylori cagA⁺ están asociadas a la ulceración péptica y al adenocarcinoma gástrico⁴. *H. pylori* infecta a más de la mitad de la población mundial ⁴ y es considerado como un carcinógeno tipo I⁵; por lo que la infección por esta bacteria se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas en el estómago⁶. El mecanismo de transmisión de la bacteria aún no está elucidado, sin embargo el mecanismo más aceptado es la transmisión fecal-oral. En la mayoría de los casos, estas infecciones se adquieren en la infancia, de padres a hijos, provocando así una inflamación crónica persistente⁵. Por otro lado, existen otros factores de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico, conocidos como factores ambientales que comprenden: la dieta, el consumo de tabaco y alcohol, la susceptibilidad del hospedero y antecedentes familiares de cáncer gástrico en primer grado⁷.

Desde el punto de vista histológico existen dos variantes del ACG: difuso e intestinal. El ACGI es el más común y afecta dos veces más a hombres, que a las mujeres ⁵. El ACGI es precedido por una cascada de lesiones: como inflamación crónica activa que afecta la mucosa gástrica normal, la cual puede progresar a GC y a GA, posteriormente se desarrolla MI (completa e incompleta); displasia (de bajo y alto grado), hasta llegar al desarrollo del ACG ⁸.

Para el diagnóstico de cáncer gástrico se utilizan técnicas invasivas como la endoscopia y toma de biopsia. Este diagnóstico desafortunadamente se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad. Por tal motivo se ha tratado de diseñar técnicas menos invasivas, mediante el uso de marcadores serológicos. Entre los más utilizados actualmente se encuentran los antígenos CEA, CA72.4, y CA19.9; sin embargo, su sensibilidad y especificidad son bajas lo cual ha limitado su uso. Por lo que en este trabajo se propone identificar alguna proteína presente en el plasma sanguíneo mediante el uso de la proteómica y que en un futuro pueda ser utilizada como un biomarcador para el diagnóstico en etapas tempranas como la gastritis crónica.

2. MARCO TEORICO O CONCEPTUAL

2.1 Factores de virulencia de *H. pylori* y su asociación con el cáncer gástrico

Existen dos factores de virulencia que han sido implicados en la desregulación de las vías de señalización celular que son responsables de desencadenar la transformación que lleva al cáncer gástrico. Estos factores son CagA y VacA. Las cuales son inyectadas y secretadas por *H. pylori*, respectivamente.

2.1.1 CagA

La proteína CagA es codificada por el gen *cagA*, que forma parte de la isla de patogenicidad *cagPAI*, el cual es un segmento de ADN de aproximadamente 40 kb, que codifica para un sistema de secreción tipo IV, a través del cual la proteína CagA es inyectada a las células epiteliales. Una vez presente en el citoplasma de la célula epitelial CagA puede ser fosforilada en el residuo de tirosina que forma parte del motivo Glu, Pro, Ile, Try, Ala (EPIYA) del cual se conocen 4 tipos diferentes A, B, C, D, los cuales se han identificado en la región polimórfica del carboxilo terminal de CagA y se distinguen por diferentes secuencias de aminoácidos que rodean al motivo EPIYA. Los motivos A y B son los más comunes en el mundo y el motivo C se encuentra normalmente en cepas de países occidentales⁵. Las cepas portadoras del motivo EPIYA C presentan un número mayor de sitios y esto es un indicador importante de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico⁹. En estudios *in vitro* se ha observado que CagA fosforilada tiene varios efectos en la célula, entre los que se encuentran: cambios en el citoesqueleto, cambios en la motilidad y apoptosis^{10, 11}. Mientras que la forma no fosforilada de CagA, se puede unir al complejo de las uniones célula-célula (E-Cadherina y β -catenina), que son proteínas que pertenecen a ZO-1¹⁰, afectando las uniones estrechas entre las células epiteliales, que provoca la pérdida de la función de la barrera celular⁴.

Ohnishi *et al.* Fueron los primeros en proporcionar evidencia experimental de la oncogenicidad potencial de CagA *in vivo*. La expresión transgénica de CagA en

ratones condujo al desarrollo de la hiperplasia epitelial y el adenocarcinoma gástrico. Así, la evidencia experimental demostró que CagA actúa como una oncoproteína promoviendo el desarrollo de cáncer gástrico asociado a la infección por *H. pylori*¹². Aunque las actividades biológicas de CagA sugieren un papel oncogénico directo, hay que señalar que dicha proteína actúa en las células del hospedero muchos años antes de que el cáncer se origine y las alteraciones en la vías de señalización inducidas por CagA es un fenómeno reversible que cambia el fenotipo celular, más no el genotipo. Debido a que la progresión tumoral requiere de la acumulación de cambios genéticos es necesario profundizar aún más en la interacción entre los procesos de señalización específicos que utiliza *H. pylori* para comunicarse con la célula huésped y la respuesta inflamatoria crónica que ésta produce¹³.

2.1.2 VacA

La citotoxina VacA es otro factor de virulencia de *H. pylori* que tiene diversos efectos en la célula hospedera. Esta citotoxina es codificada por el gen constitutivo *vacA*. La actividad de esta proteína fue encontrada cuando en el sobrenadante derivado del cultivo de *H. pylori* mostraron que inducía grandes vacuolas en la célula en diversas líneas celulares en cultivo¹⁴.

Las cepas de *H. pylori* pueden producir cantidades variables de la citotoxina VacA debido a cambios en el nivel de la secreción y variaciones en la actividad específica. Estos cambios se atribuyen a las variaciones que existen en la estructura del gen *vacA*, dentro de la región señal (s) con subtipos s1 y s2; la región media (m) con genotipo m1 y m2; y la región intermedia (i)¹⁵. Las cepas de *H. pylori* con el genotipo *s1/m1* producen más citotoxina que las cepas que presentan el genotipo de *vacA s2/m2*. Se ha reportado que aislamientos clínicos de *H. pylori* que presentan los genotipos de *vacA s1/m1* o *s1/m2* pueden ser asociadas con el cáncer gástrico. Pero en general los pacientes que desarrollan adenocarcinoma gástrico presentan cepas con el genotipo *vacA* del tipo *s1/m1*¹⁶.

Se han descrito múltiples efectos de la citotoxina VacA en las células epiteliales, que incluyen: la formación de vacuolas, el incremento de la permeabilidad paracelular y la inducción de apoptosis. Así como la formación de poros en la membrana celular, que permiten el paso de nutrientes necesarios para *H. pylori*. También se ha observado que VacA interfiere con la presentación de antígenos e inhibe la activación y proliferación de células T y B *in vitro*¹⁷, contribuyendo a la persistencia de la infección. En términos generales, se sugiere que las funciones primordiales de VacA son proporcionar nutrientes lo cual favorece el establecimiento de la bacteria. Pero además promueve la persistencia y cronicidad de la infección⁵.

2.2 Modelo carcinogénico

Parsonnet¹⁸ propuso un modelo de carcinogénesis desencadenado por *H. pylori*. La bacteria causa una inflamación prolongada en la mucosa gástrica. A su vez, esta inflamación resulta en la formación de ROS y RNOS), que tienen un alto potencial para causar mutaciones. La infección crónica y por consecuencia la inflamación crónica, causan aberraciones en la fisiología, incluyendo la pérdida de la acidez gástrica (hipoclorhidria), alteraciones en los niveles hormonales (gastrina). *H. pylori* puede promover un incremento en la apoptosis, compensado por un incremento en la proliferación de las células epiteliales, lo cual puede contribuir a la selección de células mutadas que lleva a la malignidad. En otras palabras, el modelo carcinogénico comprende dos procesos primarios: alteración en la homeostasis proliferación/apoptosis y el daño al DNA. Por otro lado, las características del hospedero así como los factores ambientales podrían influir en el proceso carcinogénico¹⁸.

2.3 *H. pylori* y la inflamación

Existen algunas evidencias que indican que para que *H. pylori* colonice por un tiempo prolongado, la bacteria ha adquirido la capacidad de evadir una reacción inflamatoria intensa¹⁹ y se ha sugerido que niveles altos de inflamación puede llevar a la pérdida de la función y estructura glandular (atrófia gástrica)⁸. Se ha investigado la relación entre la *cagPAI* y la inducción de una respuesta inflamatoria

y se ha propuesto que la isla *cagPAI*, mediante el sistema de secreción tipo IV internaliza péptido glicano en la célula hospedera. El péptido glicano interacciona con los receptores intracelulares tipo NOD1 y lleva a la activación de la respuesta pro inflamatoria dependiente de NF-kB, tal como la producción de Interleucina 8 (IL-8) y otras quimiocina por las células epiteliales. Estas quimiocina llevan al reclutamiento de células PMNs induciendo inflamación²⁰. La fase crónica de gastritis inducida por *H. pylori* se debe a una respuesta inmune inicial innata y a una respuesta inmune adaptativa de linfocitos. Las citocinas producidas por los macrófagos, en particular Interleucina 12 (IL-12) activa células colaboradoras, tales como linfocitos T cooperadores (T_{H1} , T_{H2}), con una respuesta predominante tipo T_{H1} , induciendo una respuesta inflamatoria ²¹.

2.4 Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal

Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal puede ser teóricamente explicado por mutaciones acumuladas en el DNA después de un proceso precanceroso prolongado²². El cáncer gástrico presenta células neoplásicas, que tienen la capacidad de penetrar la matriz del estroma²². Se ha investigado una serie de moléculas que tienen la capacidad de degradar el estroma, una de ellas es uPAR²³. Este se ha encontrado en células inflamatorias y en menor medida en células cancerosas en áreas de invasión del cáncer incluyendo cáncer gástrico, de colon, de mama y en cáncer oral^{24, 25}.

En los tumores gástricos se conocen dos vías de carcinogénesis. La primera y más común se conoce como el modelo supresor, que se ha reportado que afecta al 80% de los casos. Este modelo se caracteriza por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que tiene lugar paralelamente a la evolución de la alteración histológica (gastritis-metaplasia-displasia-cáncer). Incluye, de forma característica, la pérdida de la función de genes supresores, como *APC*, *p53* o *DCC* y la activación de oncogenes como *ras* o *myc*. Los tumores que se originan a través de esta vía muestran una marcada inestabilidad cromosómica, encontrándose frecuentemente anormalidades citogenéticas, aneuploidia y la pérdida de alelos. La vía alternativa o modelo mutador se caracteriza por la

aparición de mutaciones diseminadas por todo el genoma. La señal característica de esta vía es la alteración de la longitud y composición de pequeñas secuencias de bases del ADN o mejor conocidas como microsatélites. La presencia de una elevada incidencia de alteraciones en los microsatélites, se debe a un defecto en el sistema de genes reparadores del ADN (*hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2*, *GTBP*). La mutación de alguno de ellos origina una desestabilización que finalmente conduce a mutaciones generalizadas en todo el genoma^{26, 27}

2.5 Historia natural del adenocarcinoma gástrico

El adenocarcinoma gástrico es precedido por una serie de lesiones, por lo que se ha propuesto un modelo de etapas consecutivas que inicia con la transformación de la mucosa gástrica normal al desarrollo de una gastritis superficial provocada por varios factores de riesgo como: la infección por *H. pylori*, factores ambientales y factores genéticos del huésped. Después de varios años de una inflamación intensa (gastritis crónica) se desarrolla la primera lesión precancerosa, gastritis atrófica multifocal. Posteriormente ésta progresará a MI que puede ser de tipo intestino delgado o tipo completo o de tipo incompleto o colónica. Seguido de esto se presenta displasia (alto y bajo grado) y por último ACG⁸. La MI es una entidad muy frecuente en diversas poblaciones y se ha propuesto que en esta etapa se encuentran los cambios epiteliales que predisponen hacia la malignidad del epitelio gástrico.

2.6 Gastritis crónica

La historia de la gastritis crónica data desde el siglo XIX. En 1842 Cruveilhier describió la relación entre gastritis y cáncer²⁸. La gastritis se caracteriza por una infiltración de leucocitos mononucleares y neutrófilos polimorfonucleares, con una respuesta Th1 predominantemente, acompañado de citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1 β , TNF- α e IFN- γ ²⁹. La causa más frecuente de gastritis es la infección por *H. pylori* y la severidad en la inflamación puede variar con respecto al tipo de cepa que infecta. Otra característica de la GC asociada con *H. pylori* es la presencia de agregados linfoides con centro germinal⁸. Bajo ciertas

circunstancias el balance entre la respuesta Th1 y la respuesta Th2 puede modificarse, predominando una respuesta Th2, con la expresión de citocinas como IL-4, IL-5. Se ha asociado la infección con helmintos con niveles altos de IgE en suero³⁰.

En los primeros pasos en los procesos inflamatorios y atrófia gástrica no se altera el fenotipo normal de las células epiteliales, sin embargo se alteran los procesos normales de pérdida y de regeneración celular que se presentan en el epitelio gástrico³¹. La GC predispone a AG y MI. Sin embargo para elucidar los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de esas dos etapas precancerosas, se han realizado investigaciones sobre factores de transcripción CDX1 y CDX2, que se ha reportado su presencia en el fenotipo intestinal³². Estos factores de transcripción pueden estar involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales del intestino.³². En un estudio de investigación se analizó el patrón de expresión de los genes *CDX1* y *CDX2* en pacientes con gastritis crónica y la prevalencia de la expresión de *CDX1* fue significativamente mayor en mucosa con metaplasia intestinal que en mucosa que no presentaba metaplasia intestinal y es notable que la expresión de *CDX2* se encontró en mucosa fúndica y antral con la ausencia de *CDX1* y otros genes marcadores para metaplasia intestinal como *isomaltosa-sucrasa*, *defensina humana 5*, *fosfatasa alcalina*, y *MUC2* durante la progresión a metaplasia intestinal. Estos descubrimientos indican que posiblemente *CDX2* en la mucosa con inflamación crónica podría dirigir los eventos moleculares que llevan a las lesiones precancerosas³³.

2.7 Antígenos usados como marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son definidos como biomoléculas que pueden ser medidos cuantitativamente en tejidos o fluidos³⁴. El diagnóstico temprano incluye: la detección clínica, el panorama del pronóstico, el monitoreo de la respuesta al

tratamiento y la detección de tumores recurrentes. Un marcador tumoral ideal para el diagnóstico o detección debe ser detectado en fluidos biológicos, antes de que el tumor haya desarrollado la capacidad para hacer metástasis. También sería importante que un marcador tumoral pudiera reflejar exactamente el grado de la lesión en el tejido ³⁴. A continuación se describen los biomarcadores disponibles para la detección y la evaluación pronóstica del cáncer gástrico.

2.7.1 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

El CEA es un producto normal de las células de la mucosa, fundamentalmente de las células bronquiales e intestinales. Es una glicoproteína que pertenece a la familia de las moléculas de adhesión²⁶. Participa en el reconocimiento intercelular y en el anclaje celular. La alteración en los niveles de CEA que se produce en las células tumorales, facilita su diseminación y metástasis. Actualmente su baja sensibilidad y especificidad no permiten recomendarlo como prueba de detección ni como de diagnóstico²⁶. Los valores habituales de CEA en suero son de 5ng/ml. Se ha observado que alrededor del 30-50% de los pacientes con tumores gástricos se detectan un nivel elevado de este antígeno. También, se ha observado una correlación entre los niveles en suero de CEA y el estadio tumoral. La determinación de CEA en suero forma parte de los programas habituales de seguimiento en el cáncer gástrico. La sensibilidad global del CEA es del 70%, rango que varía notablemente con respecto a la localización del tumor y el nivel preoperatorio. La utilidad principal del CEA es en el seguimiento post-operatorio, para la detección de metástasis hepáticas. Existiendo un número elevado (30% de falsos positivos) debido a los errores puntuales de la técnica y a la asociación con enfermedades como broncopatías crónicas, hepatopatías, nefropatías, enfermedades intestinales inflamatorias y otros tumores²⁶.

2.7.2 Antígeno CA 72.4

Se trata de una glicoproteína tipo mucina de elevado peso molecular. Este antígeno se expresa en la mayoría de los adenocarcinomas en humanos y ciertos tejidos fetales, pero no en el tejido adulto normal. El campo de aplicación principal

de CA 72.4 es el adenocarcinoma gástrico. CA 72.4 ofrece significativamente mejores resultados que CEA, el cual se expresa en varios tipos de adenocarcinoma, pero su especificidad es baja. CA 72.4 suele ser determinado conjuntamente con el CEA, ya que se ha observado que la combinación de estos, mejora el diagnóstico clínico. Se detectan concentraciones de CA72.4 en suero superiores al valor normal (6 U/ml) en el 30-40% de los casos de adenocarcinoma gástrico. La frecuencia con la que se detectan niveles elevados es significativamente mayor en estadios tumorales avanzados, de tal modo que existe relación directa entre nivel de marcador y el estadio tumoral. Se detecta con mayor frecuencia casos positivos con invasión tumoral en la pared gástrica. Además, la presencia de niveles elevados de CA 72.4 se asocia con una evolución negativa en pacientes que han sido sometidos a una resección tumoral curativa ²⁶.

En un estudio³¹ realizado en 2009 para evaluar el nivel pronóstico del MIF, debido a que este juega un papel importante en las enfermedades inflamatorias e inmunes. Su principal función es inhibir la migración de los macrófagos. También se ha observado que es un mediador crucial de la inflamación crónica, que libera productos bioactivos de citocinas, factores de crecimiento y óxido nítrico^{35, 36}. MIF incrementó su expresión en muchos tipos de cáncer, lo cual ha sugerido que se involucra en la carcinogénesis³⁷. En otros estudios se ha relacionado el incremento de la expresión de MIF con la infección de *H. pylori*, esto en células gástricas epiteliales y células inflamatorias³⁸. En el estudio se tomó una cohorte de pacientes con confirmación histológica de adenocarcinoma gástrico y pacientes con dispepsia. Se utilizó un ELISA para medir en suero los niveles de CEA y MIF. Se pudo observar tanto en suero como en el epitelio que la expresión de MIF se incrementó en gastritis inducida por *H. pylori*, metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Por lo que MIF podría tener un papel importante en la carcinogénesis gástrica y podría ser un buen biomarcador para la detección temprana del cáncer gástrico, así como para la el pronóstico de la enfermedad³⁹.

2.8 Proteómica

Se han realizado investigaciones en muestras plasma de pacientes con cáncer gástrico y lesiones premalignas, con la finalidad de encontrar una o varias moléculas que pudieran ser utilizados como un marcador tumoral, mediante el uso de técnicas menos invasivas. Como por ejemplo en un estudio realizado en 2009 por Fu-Ming Qiu *et.al.*⁴⁰, se detectaron nuevos biomarcadores relacionados con el pronóstico en suero de pacientes con Adenocarcinoma gástrico, clasificados en grupos de buen pronóstico y mal pronóstico⁴⁰. Esto fue utilizando Espectrometría de Masas en `Tiempo de Vuelo` mediante Desorción-Ionización por Láser de Superficie (SELDI-TOF-MS). Se estableció un patrón de pronóstico que consistió en 5 péptidos con un peso molecular de 4474, 4542, 6443, 4988 y 6685 Da, los cuales fueron comparados entre ambos grupos obteniéndose una sensibilidad del 84.2% y una especificidad del 85%, lo cual lo hacía significativamente mayor que la sensibilidad y especificidad del CEA (52.6% y 70% respectivamente). Por otra parte, también se encontró que el péptido con un peso molecular de 4474 Da fue significativamente mayor en pacientes con cáncer gástrico de mal pronóstico con tiempos de supervivencia cortos en etapas avanzadas que en pacientes con un buen pronóstico de cáncer gástrico⁴⁰.

En un estudio realizado por Wentao Liu *et, al.* en 2012⁴¹ se identificaron biomarcadores en suero para cáncer gástrico usando cromatografía líquida multidimensional y electroforesis en geles diferenciales en 2D, en donde se obtuvieron los perfiles de proteínas del suero de pacientes con cáncer gástrico y pacientes voluntarios sanos. Los spots de proteínas que aumentaban o disminuían fueron seleccionados para hacer su identificación por espectrometría de masas. Se obtuvieron 17 spots que aumentaron y 7 que disminuyeron su expresión en las muestras de los pacientes con cáncer gástrico comparado con los controles. De los cuales se realizó la identificación de 7 proteínas que fueron sobreexpresadas como: el precursor de clusterina, el plasminógeno, el precursor de la apolipoproteína A-IV, kininógeno-1, el complejo formador de la glicoproteína HC, componente 4 del complemento, el precursor de la apolipoproteína J,. Las

proteínas como: el precursor del componente 3 del complemento, el precursor de hemopoxina, cadena C, la proteína C1q del sistema del complemento y PRO2044 se encontró disminuida su expresión Cabe mencionar que la proteína clusterina ha sido identificada en otros tipos de cáncer y ha sido asociada a tumores agresivos y en este estudio se encontró una expresión mayor en pacientes con tumor gástrico que en los sanos⁴¹.

2.8.1 Proteoma del plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo está constituido por componentes proteicos. El proteoma del plasma se define como aquellas proteínas presentes en el plasma que llevan a cabo funciones en la circulación, o a aquellas proteínas que se fugan hacia la sangre como resultado de un daño importante en alguno de los tejidos⁴². Con respecto a las proteínas que están presentes en el plasma sanguíneo se encuentran proteínas que son liberadas por algún tejido y que tienen una función en el plasma como es el caso de la Albumina que es secretada por el hígado y los intestinos; inmunoglobulinas que son anticuerpos para el reconocimiento de antígenos. Otro grupo de proteínas que se pueden encontrar en el plasma son los ligandos de receptores de largo alcance como péptidos y hormonas proteicas (insulina y eritropoyetina); así como también se pueden encontrar ligandos de receptores locales como las citocinas y otros mediadores a corta distancia de respuestas celulares. Otro grupo de proteínas que se puede encontrar son los denominados pasajeros temporales que incluyen a proteínas no hormonales que viajan a través del plasma temporalmente en su camino a su sitio de función primaria como son las proteínas lisosomales. Un grupo importante y que sería de nuestro interés son los productos que escapan del tejido a consecuencia de un daño o muerte celular. También se puede encontrar en el plasma secreciones aberrantes, que son proteínas liberadas de tumores u otros tejidos enfermos, no necesariamente como resultado de una función normal del organismo. Por otro lado también se podrían presentar proteínas externas, como proteínas de organismos infecciosos, que pueden ser incrementados o expuestos a la circulación⁴².

3. MAPA CONCEPTUAL

El adenocarcinoma gástrico representa un importante problema de salud a nivel mundial. Los tumores gástricos se clasifican histológicamente en 2 tipos, en difuso e intestinal. Los tumores intestinales son precedidos por una serie de lesiones denominadas lesiones precancerosas que se inician por la infección de *H. pylori* a la mucosa gástrica, induciendo una gastritis crónica, que puede evolucionar a atrofia gástrica, metaplasia intestinal y por último el desarrollo del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Durante todo este proceso se ha observado que existen cambios en la expresión genética, de tal forma que puede verse reflejado en la expresión de proteína a nivel local o sistémico (plasma sanguíneo). De tal manera que surge la pregunta de investigación: ¿existe diferencia entre los perfiles de proteínas del plasma de pacientes con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal?, la cual se pretende resolver través del uso de la proteómica, herramientas que permitirá identificar proteínas diferenciales que puedan ser potenciales marcadores para el diagnóstico temprano. En varios estudios se han identificado diferencias en la expresión de proteínas, relacionadas con procesos metabólicos, proteínas del complemento, apolipoproteínas entre otras en de pacientes con gastritis y cáncer gástrico de tipo intestinal⁴¹.

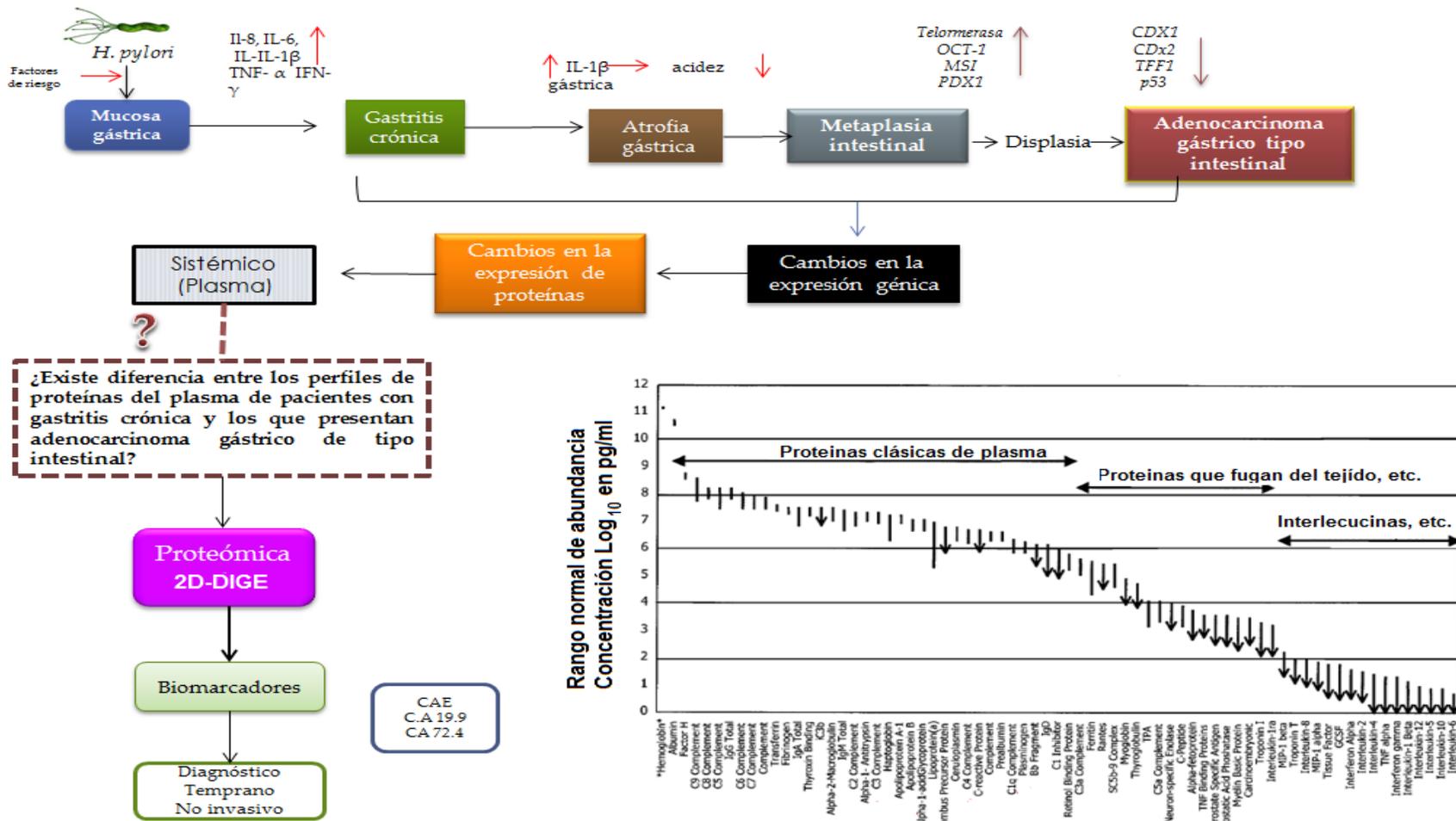


Figura 1. Mapa Conceptual

4. JUSTIFICACIÓN

La gastritis crónica predispone a lesiones precancerosas como atrofia gástrica y metaplasia intestinal que es una lesión que precede al desarrollo de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Algunos estudios de genómica, han mostrado cambios en la expresión de algunos genes que codifican para factores de crecimiento, citoquinas, moléculas reguladoras del ciclo celular, factores supresores, moléculas de adhesión celular y factores de inestabilidad genética, asociados a las lesiones pre malignas o al cáncer gástrico.

A pesar de que se han reportado cambios en la expresión de algunas proteínas en cáncer gástrico, existe un número limitado de biomarcadores disponibles para la detección y la evaluación pronóstica de esta neoplasia.

Entre los marcadores séricos que se utilizan actualmente para el pronóstico de esta enfermedad se encuentran los antígenos CEA, CA 72.4, y CA19.9; sin embargo, su sensibilidad y especificidad son bajas lo cual ha limitado su uso como prueba diagnóstica.

Por lo anterior, la identificación de nuevas moléculas en plasma con herramientas como la proteómica permitirá ampliar la gama de moléculas que potencialmente puedan ser utilizados para la detección en forma temprana cáncer gástrico y el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico no invasivas.

5. HIPOTESIS

Existe diferencia entre los perfil de proteínas del plasma de pacientes con gastritis crónica y los que presentan adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar los perfiles de proteínas presentes en plasma de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* y diagnosticados con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal.

6.1.1 Objetivos particulares

Obtener los perfiles de proteínas presentes en el plasma de pacientes con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

Comparar el nivel de expresión de las diferentes proteínas entre ambos grupos e identificar proteínas diferenciales.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio

Estudio experimental

7.2 Definición y selección de la población de estudio

7.2.1 Población de estudio

Banco de muestras de plasma sanguíneo de pacientes que acudieron al servicio de endoscopia del Instituto Nacional de Cancerología INCAN, con indicación médica de endoscopia para el diagnóstico de alguna enfermedad gástrica. Este banco pertenece a un proyecto de investigación titulado "Identificación de Biomarcadores Asociados a Lesiones Gástricas Premalignas y de Transformación a Cáncer por Medio de Electroforesis Bidimensional y Espectrometría de Masas (LC-MS) al cual se encuentra anidado este proyecto.

7.2.2 Selección de los grupos de estudio

Se seleccionaron las muestras de plasma sanguíneo de pacientes que desearon participar en este proyecto y cumplieron con los criterios de inclusión.

7.3 Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años, que no hayan sido sometidos a cirugía gástrica, quimioterapia, tratamiento contra el cáncer y *H. pylori* y que no hayan tomado antiinflamatorios o inhibidores de la bomba de protones en los últimos 30 días.

7.4 Criterios de exclusión

- Pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión
- Pacientes que hayan presentado alguna otra patología (VIH, Diabetes, etc.)

7.5 Selección de muestras para el análisis proteómico

Se seleccionaron las muestras de pacientes que cumplieron con los siguientes requisitos:

- Aquellos que fueron positivos a *H. pylori*
- Aquellos que tuvieron diagnóstico confirmatorio de gastritis crónica o Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal

7.6 Formación de los grupos de estudio

Se formaron 2 grupos de estudio. El primer grupo se formó con 3 muestras de pacientes que tuvieron diagnóstico confirmatorio de gastritis crónica, el segundo grupo se formó con 3 muestras de pacientes que tuvieron diagnóstico de Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Los 2 grupos con diagnóstico positivo de *H. pylori*. Se buscaron que estos grupos fueran lo más homogéneo posible en cuanto a edad. Todas las muestras utilizadas fueron de pacientes del sexo masculino.

7.7 Métodos experimentales

7.7.1 Toma y manejo de muestras biológicas

- **Biopsias:** fueron tomadas por médicos endoscopistas expertos con los procedimientos establecidos por el INCAN. Estas muestras se almacenaron a -70° C.
- **Plasma sanguíneo:** el plasma se obtuvo por centrifugación durante 10 minutos a 2000 x g a 4°C, separando glóbulos blancos y rojos, sin embargo las plaquetas no eliminan, por lo es necesario realizar una segunda centrifugación durante 15 minutos a 2500 x g a 4°C.

Estas muestras biológicas (biopsias y Plasma sanguíneo) fueron de un banco ya formado que pertenece al proyecto de investigación titulado “Identificación de Biomarcadores Asociados a Lesiones Gástricas Premalignas y de Transformación

a Cáncer por Medio de Electroforesis Bidimensional y Espectrometría de Masas (LC-MS) al cual se encuentra anidado este proyecto.

7.7.2 Positividad a *H. pylori*

7.7.2.1 Detección de anticuerpos anti *H. pylori* por Western Blot

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo al procedimiento de Laemmli en 1970⁴³. Se colocó un marcador de peso molecular preteñido (fermentas SM0441) de 118-20 kDa. Se colocaron 200 µg de protoplastos de *H. pylori* y se ajustó un volumen de 200 µl con buffer de muestra 1x (Tris Base (Promega HS131) 0.125M pH 6.8, SDS (GibcoBRL 15525-017) al 4%, Glicerol (J.T.Baker 2136-01) 20%, 2-mercaptoetanol (al 10%), para después iniciar la separación de proteínas se realizó a un voltaje constante de 110 V durante 90 minutos y se realizó la transferencia en una cámara de transferencia (BIORAD 170-3930) a 200 Amp durante 90 minutos. Posteriormente se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con leche Svelty sin grasa (Nestle ®) al 10% con Buffer fosfato salino (PBS) 1X durante 1 hora. Después se lavó la membrana con PBS 1X/Tween 0.05% durante 5 minutos. Se cortó la membrana en tiras de 0.5 cm de ancho. Cada tira se colocó en pequeñas canaletas y se agregó el suero del paciente como primer anticuerpo a una dilución 1:200 en leche al 10% en PBS 1X y se incubó durante toda la noche. Al siguiente día se lavó dos veces durante 5 minutos con PBS1x/Tween 0.05%. Posteriormente se colocó el segundo anticuerpo (Anti-IgG Humana/fosfatasa Alcalina producida de cabra) preparado a una dilución 1:2000 en leche al 10% y PBS 1X y se dejó 4 horas en incubación. Transcurrido el tiempo las tiras se lavaron 2 veces con PBS 1X/Tween 0.05%. Seguido de esto se lavó con NaHCO₃ 0.1 M - MgCl₂ 1 mM, pH 9.8 durante 5 minutos. Posteriormente se retiró esta solución y se agregó el sustrato para fosfatasa alcalina [Cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich B8503-1G)] al 1.25% y [5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl) di-hidrogeno fosfato (BCIP) (Sigma-Aldrich N6876-1G)] al 1.25%) en NaHCO₃ 0.1 M - MgCl₂ 1 mM, pH 9.8, durante 10 minutos.

7.7.3 Preparación de la muestra de plasma para el análisis proteómico

7.7.3.1 Eliminación de Albumina Sérica Bovina e inmunoglobulinas en plasma sanguíneo

La eliminación de albumina e inmunoglobulina G se realizó de acuerdo a lo indicado en el kit el Albumin and IgG Depletion SpinTrap (Ge Healthcare 28-9480-20) el cual consta de una columna que contiene una mezcla de Sepharosa Anti-HSA y proteína G de alto rendimiento. La mezcla consiste de perlas de agarosa con ligandos de afinidad inmovilizados. Se preparó un buffer de unión que contiene fosfato de sodio (USB 20229) 20mM y cloruro de sodio (J.T.Baker 3625-05) 0.15 M ajustado a un pH= 7.4. Se diluyeron 50 µl de plasma en 50 µl de buffer de unión en un tubo eppendorf. La columna se preparó, eliminando el buffer de almacenamiento que contenía, invirtiendo y agitando la columna, la cual posteriormente se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2ml y se centrifugó en una centrifuga (Eppendorf 5415C) durante 30 segundos a 100 x g, eliminando el eluído. Posteriormente la columna se coloca en un tubo nuevo de microcentrífuga de 2ml, se equilibra adicionando 400 µl de buffer de unión, se centrifugó durante 30 segundos a 800 x g, eliminando el eluído. Este último paso se realizó en dos ocasiones. Seguido de esto, la columna se transfiere a un tubo de microcentrífuga nuevo y se adicionó el plasma diluido., incubando durante 5 minutos sin mezclar. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 30 segundos a 800 x g y el eluído se colectó. Se adicionaron 100 µl de buffer de unión y se centrifugó durante 30 segundos a 800 x g, colectando el eluído. Este último paso se realizó en 2 ocasiones. En este último eluído se obtuvo el plasma sin albumina e Inmunoglobulinas, el volumen final obtenido fue de 300 µl.

7.7.3.2 Eliminación de sustancias interferentes

La eliminación de sustancias interferentes como lípidos, detergentes, ácidos nucleicos de la muestra se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare 80-6484-51). Las muestras se procesaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Todos los pasos se llevaron a cabo en frío. Se colocó

en un tubo de microcentrifuga 100 μ l de la muestra de plasma depletado, agregando a esta 300 μ l de precipitante, se mezcló y se incubó durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 300 μ l de co-precipitante. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga (Eppendorf 5415C) a 12,000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó únicamente la pastilla. A la cual se le adicionaron 40 μ l de co-precipitante y se incubó durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó a 12,000 x g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. A la pastilla obtenida se le adicionaron 25 μ l de agua desionizada y se agitó brevemente de 5-10 segundos. Se agregó 1 μ l del buffer de lavado (que debe estar al menos 1 hora a -20°C) y 5 μ l del aditivo lavado. Se agitó hasta dispersar completamente la pastilla. Se incubó a -20°C durante 30 minutos, agitando en intervalos de 10 minutos. Seguido de esto, se centrifugó a 12,000 x g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se re-suspendió en 100 μ l de la solución stock de rehidratación para el IEF que contiene Urea 8M, y CHAPS 2% ⁴⁴.

7.7.4 Ajuste de pH de la muestra de proteínas plasmáticas

Debido a que para el experimento de 2D- DIGE se debe ajustar el pH de la muestra a 8.5. A 300 μ l de la muestra de proteínas de plasma re suspendidas en Buffer de rehidratación se le adicionaron 6 μ l de Tris-Base Base (Promega H5131) 500mM a pH 9.5.

7.7.5 Cuantificación de proteínas

Después de ajustar el pH de la muestra de proteínas del plasma se realizó la cuantificación de proteínas de acuerdo a las instrucciones del kit 2D- Quant (GE Healthcare 80648356). Este procedimiento funciona cuantitativamente al precipitar proteínas. La técnica se basa en la unión específica de iones de cobre a la proteína. Las proteínas precipitadas se re-suspendieron en una solución que contiene cobre y el cobre que no se une a la proteína se cuantificará haciéndolo reaccionar con un cromóforo. La absorbancia de la solución es inversamente

proporcional a la concentración de proteína. El ensayo tiene una respuesta lineal a la proteína en un intervalo de 0-25 µg.

Se preparó una curva estándar usando solución estándar de Albumina Sérica Bovina a una concentración de 2 mg/ml, en un rango de 0 -25 µg. Para las muestras de plasma se utilizó 5 µl de estas. Se agregaron 250 µl de precipitante a cada uno de los tubos, se agitaron brevemente e incubaron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 250 µl de co-precipitante y se agitaron brevemente. Se centrifugó a 10,000 x g durante 5 minutos, y eliminó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 50 µl de solución cobre y 200 µl de agua destilada. Cada tubo se agitó hasta disolver el precipitado de proteínas. Se agregaron 500µl de solución colorimétrica, agitando brevemente y se Incubaron de 15-20 minutos. Transcurrido el tiempo, se tomaron 200 µl de cada uno de los tubos de la curva estándar así como de las muestras y se colocaron en una placa de Elisa y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de absorbancia de la marca *BIO-RAD* (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135), el cual, mediante el software Microplate Manager® se obtuvo la gráfica de la curva estándar y se calculó la concentración de la muestra⁴⁵.

7.7.6 Ajuste de concentración de proteínas

Debido a que para el experimento de 2D-DIGE se deben colocar volúmenes iguales de cada muestra, es necesario ajustar la concentración de proteínas tomando la muestra con concentración más baja y así ajustar las demás muestras a esa concentración. El ajuste se hace con buffer de rehidratación con pH 8.5.

7.7.7 Gel de integridad de las muestras de proteínas de plasma.

La integridad y concentración de las proteínas presentes en las muestras que se va a utilizar en el análisis proteómico se verificó por electroforesis en un gel de

acuerdo al procedimiento de Laemmli en 1970⁴³, a una concentración de acrilamida al 12% (30% de acrilamida, 0.8% de bisacrilamida), Tris- HCl (USB 22676) pH 8.8 0.375M, SDS (GibcoBRL 15523-012) al 0.2%, Persulfato de amonio (GibcoBRL 15523-012) al 10%, TEMED(Sigma-Aldrich T-8133) al 10% y agua bidestilada. Se colocó un marcador de peso molecular pre teñido (fermentas SM0441) de 118-20 kDa y un estándar de 10 µg de BSA. En cada pozo se colocaron 10 µg de proteínas de plasma y se ajustó un volumen de 15 µl con buffer de muestra [Tris-Base (Promega H5131) 0.125M pH 6.8, SDS (GibcoBRL 15525-017) a 4%, Glicerol (J.T.Baker 2136-01) 20%, 2-mercaptoetanol al 10%]. La separación de proteínas se realizó a un voltaje constante de 80 V durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el gel fue teñido con azul de coomasie [Coomasie Blue G-250 (Amiresco 6104-58-1) 0.125%, Metanol (J.T.Baker 9040-03) al 50%, y ácido acético (Reamex) al 10%] durante 1 hora. Después se destiño durante una hora en una solución de metanol al 50%, y ácido acético al 10%, posteriormente se destiñó en una solución de Metanol al 5% V/V, ácido acético al 7% V/V hasta que el gel quedara transparente.

7.7.8 Estandarización de la Electroforesis 2D.

Para estandarizar las condiciones de la electroforesis 2D se hicieron varios geles de prueba para establecer los parámetros óptimos para obtener los mejores resultados. Se utilizaron tiras de 7cm de la marca BIORAD 163-2000 pH 3-10. Inicialmente se utilizó el siguiente protocolo para IEF: 1er paso 300V durante 30 min, 1er gradiente 1000V durante 30 min, 2do Gradiente 5000 V durante 80 min, 2do paso durante 25 min. Sin embargo, a pesar de que en la muestra de plasma se habían eliminado las sustancias interferentes no se obtuvieron los resultados esperados, probablemente debido a que la muestra contenía sales que interferían en la separación de proteínas por punto isoeléctrico. Por lo tanto, se tomó la decisión de utilizar un protocolo para IEF utilizado en muestras de orina humana, la cual contiene muchas sales. Utilizando las siguientes condiciones: un paso inicial de 100 V a 100 Vh, segundo paso 300 V a 200 Vh, primer gradiente de 1000 V a 300 Vh, segundo gradiente de 5000 V a 4500 Vh y un tercer paso de 5000 V a

2000 Vh, con 50 μ A/tira a 20 °C. Con respecto a la segunda dimensión primeramente, se prepararon geles de acrilamida al 12.5% de acuerdo al procedimiento de Laemmli en 1970⁴³. La separación de proteínas por peso molecular fue a 80 V de corriente constante durante 4:30 horas. Para poder observar el patrón de proteínas con esas condiciones se tiñó el gel con el fluoróforo SYPRO® Ruby Protein Gel Stain.(Sigma S-4942-1) y se utilizó el siguiente protocolo: una vez terminada la separación de proteínas por tamaño molecular, el gel se colocó en un recipiente de plástico y se lavó durante 30 minutos en una solución de metanol al 10% y ácido acético al 7%. Transcurrido este tiempo, se remueve la solución de lavado y se agregaron 50 ml de SYPRO directamente al gel y se dejó en incubación toda la noche. Al día siguiente se retiró el fluoróforo y se colocó una solución de fijación que contiene metanol al 10 % v/v y ácido acético al 7% v/v. Después de este tiempo la solución de fijación fue retirada y el gel se colocó en agua bidestilada para visualizar las proteínas teñidas se utilizó un transiluminador (El sistema DigiDoc-It™ de UVP, 97-0246-01).

7.7.9 Preparación de la muestra para 2D-DIGE

7.7.9.1 Preparación del fluoróforo CyDye para el marcaje de proteínas

7.7.9.1.1 Reconstitución del fluoróforo CyDye (solución Stock)

La reconstitución del fluoróforo se realiza con dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich 2207056) para obtener una concentración de 1nmol/ μ l de cada uno de los fluoróforos CyDye Cy2, Cy3, Cy5 (CyDye DIGE Fluor minimal dyes 5nmol GE Healthcare 25-8010-83). Se tomó el recipiente de cada uno de los fluoróforos y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agito brevemente en el vortex y se colocaron 5 μ l de DFM (Sigma- Aldrich 2207056) a cada tubo de fluoróforo que contiene 5 nmol para obtener la solución stock de 1 nmol/ μ l. La mezcla se agitó durante 30 segundos, para después centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 12000 x g⁴⁶.

7.7.9.1.2 Dilución de la solución stock

Para el marcaje de 10 μg de proteína se recomienda una usar 80 pmol de fluoróforo. Previo al marcaje de proteínas se preparar la solución de trabajo. La solución stock de 1 nmol/ μl se centrifugó a pulso durante 30 segundos a temperatura ambiente. Y en un tubo de microcentrífuga se colocaron 5.75 μl de DMF (Sigma- Aldrich 2207056) y 0.5 μl de la solución stock para obtener una concentración final de 80 pmol/ μl .

7.7.9.2 Marcaje de proteína

7.7.9.2.1 Marcaje del estándar interno

Para formar el estándar interno, se tomó 1.52 μl de cada una de las muestras de plasma (2 casos y 2 controles) que contenían 1.64 μg de proteína y se mezclaron en un tubo de microcentrífuga, formando así un estándar con 10 μg de proteína total. A este volumen se le agregó 1 μl de la solución del fluoróforo CyDye Cy2 con una concentración de 80 pmol/ μl . Se mezcló y agito en un vortex. Posteriormente se le dio un pulso en la centrifuga para recuperar la solución en la parte inferior del tubo y se dejó incubando en la oscuridad en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 μl de L-lisina (Sigma-Aldrich L5501) 10mM para parar la reacción. Se mezcló suave con el dedo y se centrifugó a pulso. Posteriormente se dejó incubando durante 10 minutos en la oscuridad y en hielo.

7.7.9.2.2 Marcaje de las muestras

Individualmente las muestras de GC y ACGI se marcaron con los fluoróforos Cy3 y Cy5 de manera aleatoria. En un tubo de microcentrífuga se colocaron 10 μg de proteína y se adicionó 1 μl de la solución del fluoróforo (80 pmol/ μl) Cy3 o Cy5 según correspondió. Se mezcló suave con el dedo y se agitó en el vortex. Posteriormente se centrifugó a pulso para recuperar la solución en la parte inferior del tubo y se dejó incubando en la oscuridad en hielo durante 30 minutos.

7.7.10 Primera dimensión o Isoelectroenfoque IEF

7.7.10.1 Preparación de la muestra

En un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml se combinaron las muestras marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 y a esta mezcla se le adicionó un volumen igual al volumen obtenido al mezclar todas las muestras. En la Tabla 1 se muestra como se realizó el marcaje. Se mezcló suave con el dedo y se le dio un pulso en la centrifuga. Se dejó en hielo y en la oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente se ajustó a un volumen final de 125 µl adicionando la solución de DeStreak (GE 17-6003-19), los anfolitos (BIORAD 163-2094 pH 3-10) para obtener 2% y DTT (USB 153925GM) en polvo a una proporción de 2.8mg/ml. Esta mezcla se colocó en una canaleta de una caja de acrílico procurando distribuirla en forma homogénea y sobre esta se colocó la tira (Immobiline Dry Strip pH 3-10, BIORAD, 7cm) con el lado del gel hacia abajo, evitando hacer burbujas, sobre la tira se colocó aceite mineral (GE 17-1335-01) y se rehidrató durante 14 horas de forma pasiva, en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo la tira se colocó en la unidad de IEF (GE Healthcare Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit 11-0033-64). El protocolo de isoelectroenfoque fue como se muestra en la Tabla 2.

		10µg Muestra	2.5µg Muestra	Rojo Cy3 80pmol/µl	Azul Cy5 80pmol/µ	Amarillo Cy2 80pmol/ µl
Tubo 1	P029	6.1µl	-	1µl		
Tubo 2	P045	6.1µl			1µl	
Tubo 3	P050	6.1µl	-		1µl	
Tubo 4	P056	6.1µl		1µl		
Estándar X 2	P029		1.52 µl			1µl A cada tubo estándar
	P045		1.52 µl			
	P050		1.52 µl			
	P056		1.52 µl			

		Parar reacción	
		lisina 10 mM	
		10 minutos en hielo	
		Mezclar suave con el dedo. Dar un pulso.	
		unir muestras marcadas Cy2,Cy3,Cy5	
Tubo	VT (Cy3,Cy5,Cy2)	VT	BR pH 8.5
1	8.1+8.1+8.08	24.28 µl	24.28 µl
2	8.1+8.1+8.08	24.28 µl	24.28 µl

Mezclar fuerte en vortex. Dar un pulso 30 minutos en hielo en la obscuridad	
1 µl	
1 µl a cada tubo estándar	
Mezclar suave con el dedo. Dar un pulso. 10 minutos en hielo	
Mezclar suave con el dedo. Dar un pulso. Dejar 10 min en la obscuridad en hielo	

Tabla 1. Diseño experimental general para el marcaje de proteínas para 2D-DIGE. P029, P035, P045 muestras de proteínas de pacientes caso (ACGI). P050, P044, P056 muestras de proteínas de pacientes control (GC). VT es el volumen total, que se obtuvo al mezclar cada muestra marcada con cada CyDye. BR es el buffer de rehidratación a pH 8.5.

	50 μ A/Tira	20°C
Paso	100 V	100 Vh
Paso	300 V	200 Vh
Gradiente	1000 V	300 Vh
Gradiente	5000 V	4500 Vh
Paso	5000 V	2000 Vh

Tabla 2. Protocolo para la separación por punto Isoeléctrico IEF

7.7.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida Segunda dimensión

7.7.11.1 Equilibrio de los geles de primera dimensión

Una vez que se realizó el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron en 5 ml de buffer de equilibrio [Tris Base (Promega H5131) 75mM, Urea (USB U575826) 6M, Glicerol (J.T. Backer 2136-01) 30%, SDS (GibcoBRL 15525-017) 2%], al cual se le agregó DTT en polvo (USB 1539725GM) (10mg/ml) y se incubó durante 15 minutos en agitación suave en un agitador de bandeja y posteriormente en otros 5 ml de buffer de equilibrio suplementado con Iodoacetamida (GE Healthcare RPNG302V) (25mg/ml) la tira se incubó en agitación en un agitador de bandeja durante 15 minutos.

7.7.11.2 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Después de equilibrar las tiras, se realizó la separación de proteínas en geles con gradiente de acrilamida 4-20 % (BIORAD (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, IPG/prep well, 7 cm IPG strip/450 μ l #456-1091). En donde la tira se pegó al gel con agarosa (GibcoBRL 15517014) al 0.5% con buffer de corrida .La separación

de proteínas se realizó a un voltaje constante de 80 V utilizando buffer de corrida [Tris-base (Promega H5131) 25 mM, Glicina (Invitrogen 15527-013) 192 mM, SDS (GibcoBRL 15525-017) 0.1 %] durante 2:15 horas, en una cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Cell 165-8000).

7.7.12 Obtención de la imagen

Los geles fueron escaneados en el Instituto Nacional de Medicina Genómica en la unidad de proteómica, en un Thyphoon FLA-7000 (GE Healthcare 28-9558-09). Mediante el software de control, se ajustan las condiciones para escanear los geles. Para el fluoróforo Cy2 se utilizó un láser de 488 nm y un filtro de emisión 520 nm BP40, para Cy3 se utilizó un láser de 532 nm y un filtro de emisión de 580 nm BP30, para Cy5 se utilizó un láser de 633 nm y un filtro de emisión de 670 BP30.

8. RESULTADOS

8.1 Pacientes con diagnóstico de Gastritis Crónica o Adenocarcinoma

Gástrico.

En la Tabla 3 se muestran los pacientes seleccionados por el diagnóstico histopatológico, edad y sexo, así como la positividad a *H. pylori*. En los casos como en los controles los pacientes fueron del sexo masculino para disminuir la variabilidad en las muestras debido a los cambios hormonales y se buscó aparear las muestras por edad lo más homogéneo posible.

CASOS		
FOLIO	EDAD	DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO
P050	48	AGI, MD, AS
P056	68	AGI, MD
CONTROLES		
P045	43	GCLI
P029	68	GCMA

AGI: Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal
MD: Moderadamente Diferenciado
AS: Anillo de sello
GCLI: Gastritis Crónica Leve inactiva
GCMA: Gastritis Crónica Moderadamente Inactiva

Tabla 3. Pacientes incluidos en el estudio proteómico

8.2 Positividad a *H. pylori*

La positividad a la infección de *H. pylori* de los pacientes considerados para el análisis se determinó por Western Blot. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los siguientes criterios descritos por Lepper⁴⁷. Un suero se considera positivo a la infección por *H. pylori* si cumplen alguno de los siguientes criterios:

- Si se observa al menos una banda con peso molecular de 136 o 87 o 66 kDa o alguna de estas bandas en combinación con otra banda. Ya que la banda de 136 kDa corresponde a la proteína CagA, la banda de 87 kDa corresponde a VacA y la banda de 66 kDa corresponde a UreB, todas estas proteínas específicas de *H. pylori*⁴⁷.
- Si se presenta al menos 2 bandas de ≤ 33 kDa.

En la Figura 2 se muestran los patrones de banda de los diferentes sueros de los pacientes incluidos al análisis proteómico que resultaron positivos a los antígenos de *H. pylori*, así también se puede observar la variabilidad en la respuesta inmune de IgG de los pacientes.

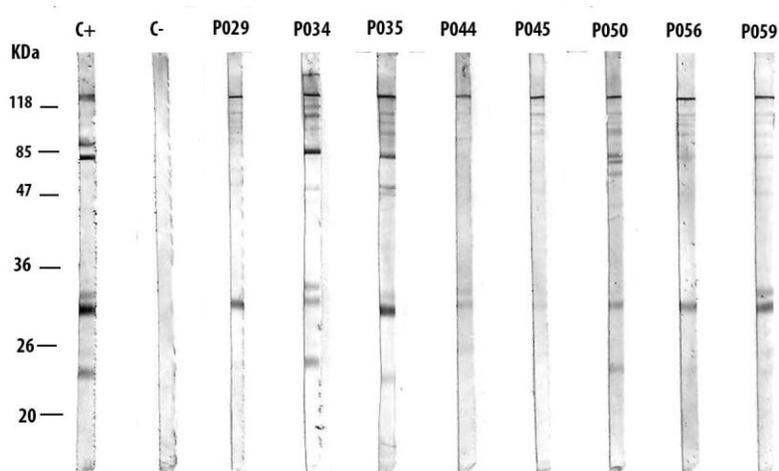


Figura 2. Pacientes positivos a *H. pylori* diagnosticados mediante Western Blot. En la primera y segunda columna se muestran la tira diagnóstica de los controles positivo (C⁺) y negativo (C⁻) respectivamente. De la tercera a la décima columna se muestran las tiras

diagnosticas de los pacientes con folio P029, P034, P035, P044, P045, P050, P056, P059 respectivamente.

8.3 Cuantificación de proteína

Los resultados de la cuantificación de proteína de las muestras de plasma parcialmente purificada y después de eliminar las sustancias interferentes se muestran en la Tabla 4.

Muestras	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
P029	1.82
P045	1.64
P050	2.35
P056	2.91

Tabla 4. Concentración de proteína de las muestras de plasma incluidas en el análisis proteómico

8.4. Integridad de las muestras.

En la Figura 3 se muestra el patrón electroforético de las muestras plasma que se procesaron para realizar el 2D-DIGE. En la Figura 3 se puede observar la eficiencia de la eliminación de albumina, ya que la banda correspondiente a esa proteína se ve muy reducida en las muestras de plasma. También se puede observar una homogeneidad el patrón electroforético entre las diferentes muestras, lo que indica que las muestras fueron cuantificadas de manera correcta y no están degradadas.

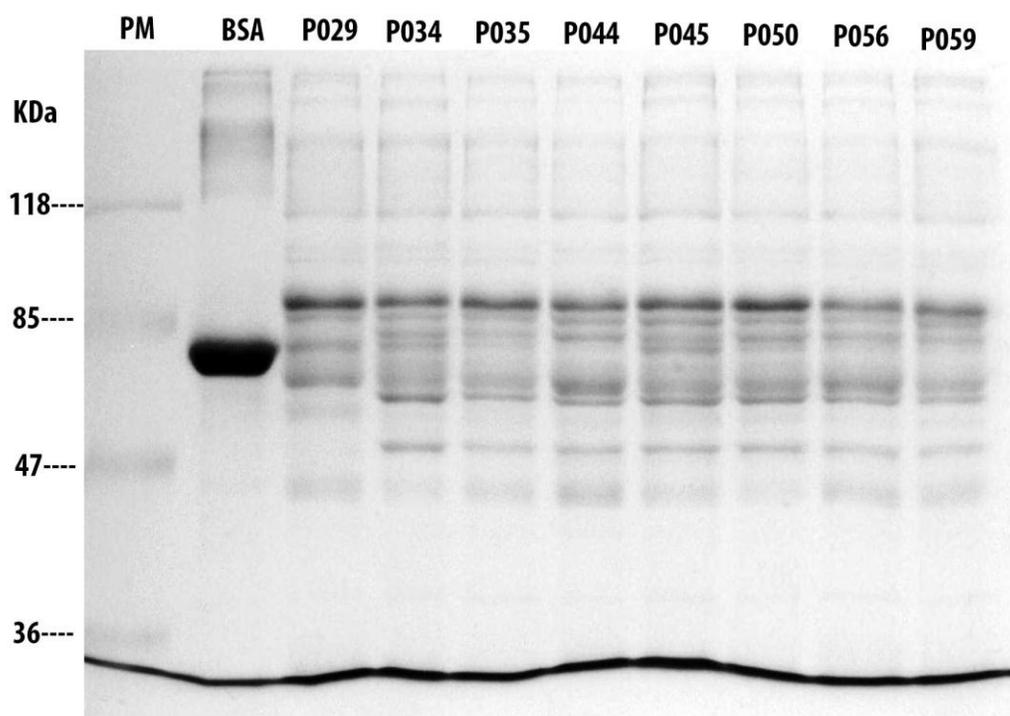


Figura 3. Gel de integridad de las muestras de plasma para el análisis proteómico. PM, marcador de peso molecular; BSA, Albumina Sérica Bovina (10 μ g) utilizada como un estándar; P029, P034, P035, P044, P045, P050, P056, P059, corresponde a las muestras de plasma (10 μ g). El procedimiento se realizó como se indica en materiales y métodos.

8.5 Electroforesis 2D

8.5.1 Resultados preliminares

En la Figura 4 se muestra la segunda dimensión de las proteínas separadas siguiendo el protocolo final de IEF y un gel de 12.5% de acrilamida para la segunda dimensión. Se observa que el IEF funcionó, pero en la segunda dimensión no se logró una separación adecuada, ya que la mayoría de las proteínas se observaban en la parte superior del gel. .

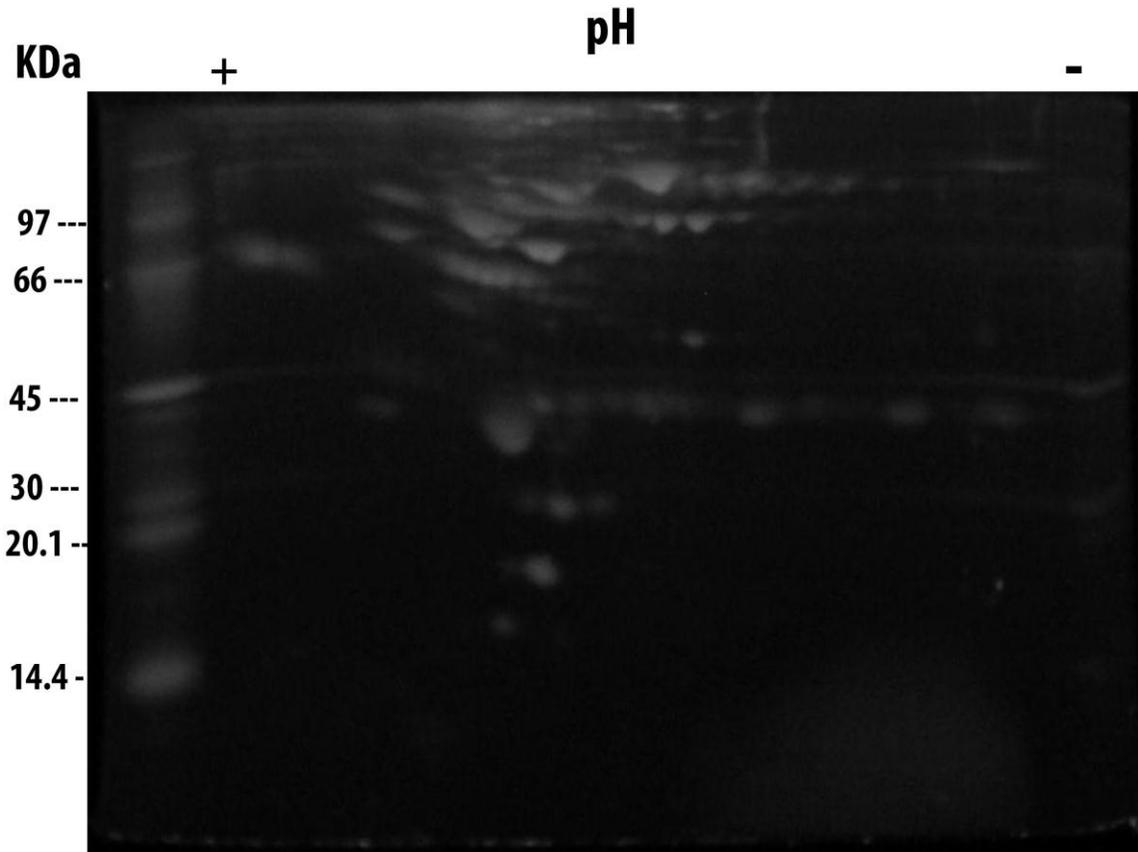


Figura 4. Proteínas del Plasma 045 separadas, siguiendo el protocolo final de IEF (50 µg de proteína) y en la electroforesis 2D en gel de acrilamida al 12.5%

Por tal motivo se decidió utilizar geles con gradiente de acrilamida 4-20 % de la marca BIORAD (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, IPG/prep well, 7 cm IPG strip/450 µl #456-1091). Se utilizó el protocolo final de IEF como se muestra en la Tabla 2 y las condiciones para la segunda dimensión fue de 80 V durante 2:15 Hrs. Posteriormente el gel fue teñido con el fluoróforo SYPRO® Ruby utilizando el procedimiento mencionado en la metodología. El patrón de proteínas mostró una buena separación por punto isoeléctrico y por peso molecular como se observa en la Figura 5. Por tal motivo estas fueron las condiciones óptimas a las cuales se realizaron los experimentos de DIGE.

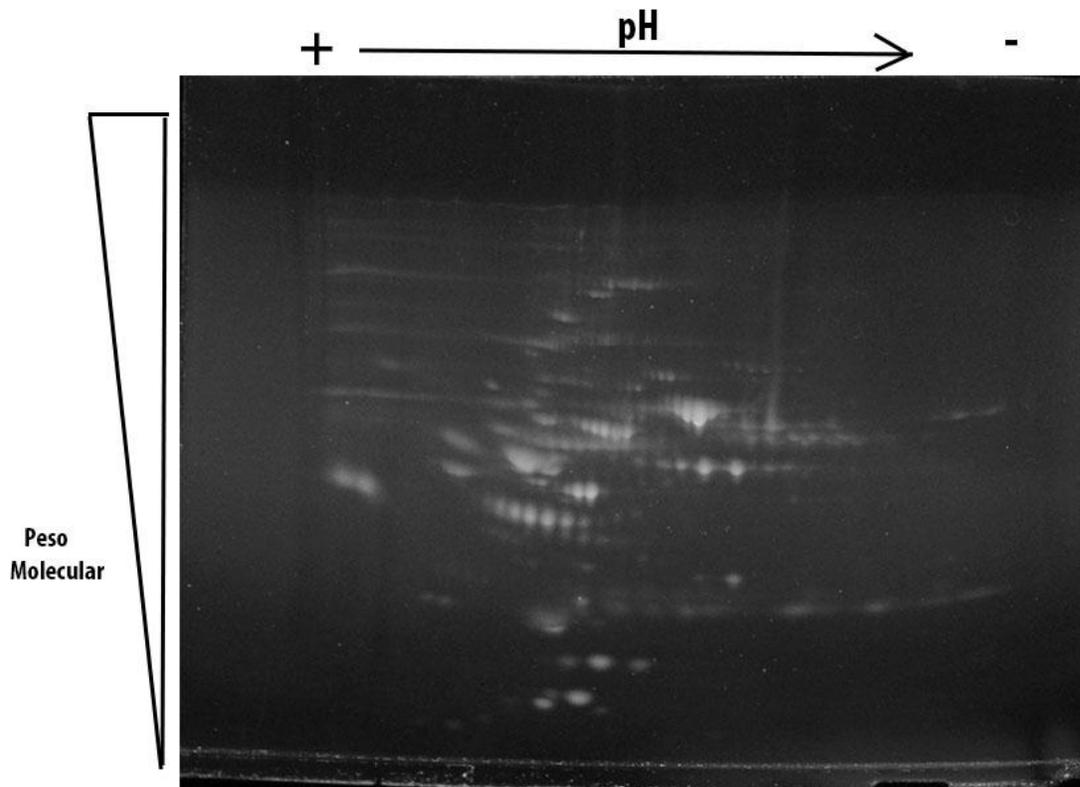


Figura 5. Proteínas del Plasma 045 separadas siguiendo el protocolo final de IEF (50 μ g de proteína) y la electroforesis 2D en gel con gradiente de acrilamida 4-20 % (BIORAD 456-1091)

8.6 2D- DIGE

8.6.1 Resultados Preliminares

Previo al experimento de las muestras seleccionadas para el análisis proteómico, se decidió realizar un ensayo de prueba con 2 muestras de plasma (P035 y P045) de dos pacientes con gastritis. Se hizo un ajuste para igualar la concentración de proteína de las muestras y colocar el mismo volumen al momento de marcar. Se utilizaron 10 μ g de proteínas por muestra para ser marcados con Cy3 o Cy5 según correspondió y 5 μ g de proteína por muestra para formar el estándar interno, el cual fue marcado con Cy2.

En la Figura 6 se muestran las 3 imágenes obtenidas de un solo gel de acrilamida marcado con CyDye, así como un empalme de las 3 imágenes para poder observar alguna diferencia. Como se compararon dos pacientes con gastritis se puede apreciar de acuerdo al patrón del estándar interno que el patrón electroforético es muy similar entre ambos pacientes (imagen B vs imagen C), sin embargo hay ligeras diferencias en cuanto a la intensidad de algunas proteínas entre los dos pacientes.

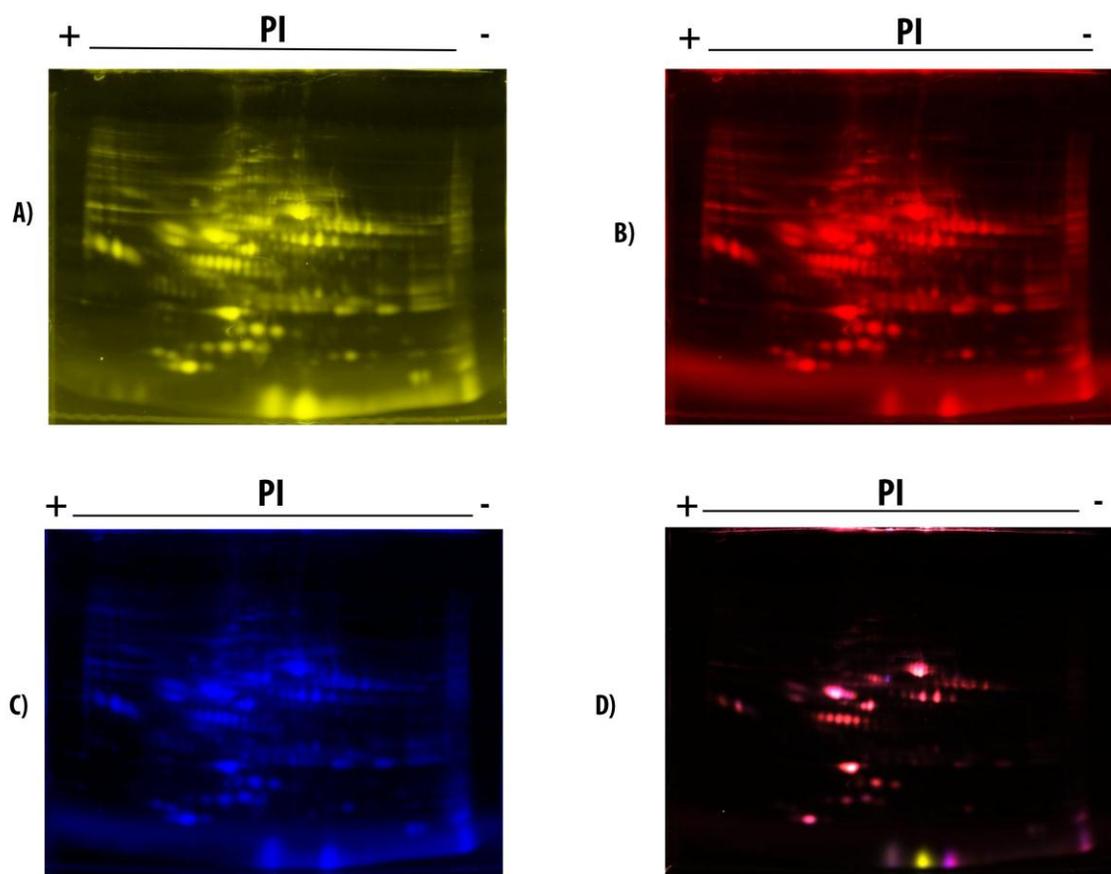


Figura 6. Perfil de proteínas de plasma P035 y P045 separados con 2D-DIGE. A) Imagen de estándar interno marcado con Cy2. B) imagen del plasma P035, marcado con Cy3. C) Imagen del plasma P045 marcado con Cy5. D) Imagen empalmada de los 3 geles, teñidos con CyDye.

En la Figura 7 se muestran las 3 imágenes obtenidas de un solo gel de acrilamida marcado con CyDye, así como un empalme de las 3 imágenes para poder observar alguna diferencia. Se compararon dos pacientes uno con GC y el otro con ACGI, por lo cual los perfiles de expresión se puede apreciar algunas diferencias de acuerdo al patrón del estándar interno que el patrón electroforético es muy similar entre ambos pacientes (imagen B vs imagen C), sin embargo hay ligeras diferencias en cuanto a la intensidad de algunas proteínas entre los dos pacientes.

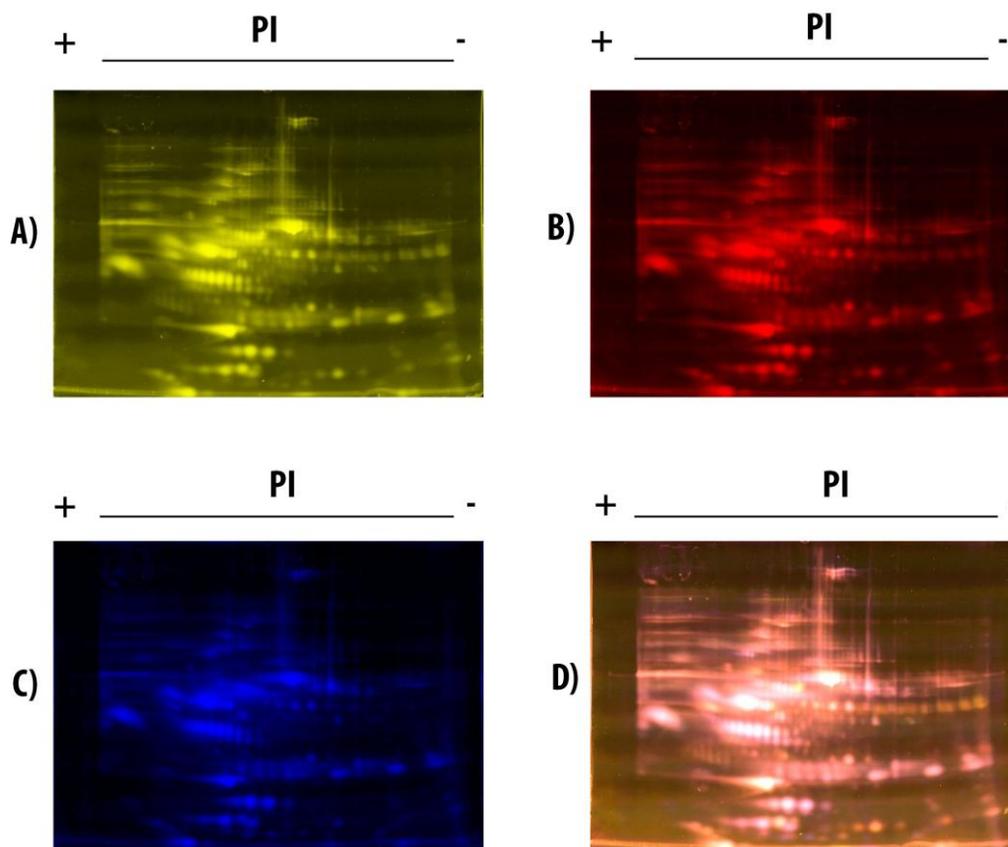


Figura 7. Perfil de proteínas de plasma P044 y P035 separados con 2D-DIGE. A) Imagen de estándar interno marcado con Cy2. B) imagen del plasma P044, marcado con Cy3. C) Imagen del plasma P035 marcado con Cy5. D) Imagen empalmada de los 3 geles, teñidos con CyDye.

8.6.2 Resultados finales

Una vez estandarizado las condiciones para 2D-DIGE se hizo el experimento final con las muestras seleccionadas. Se procesaron simultáneamente 3 geles en las mismas condiciones de IEF y DIGE. En la Figura 8 y Figura 9 se muestra los perfiles de proteínas obtenidos de las muestras analizadas marcadas con Cy3 y Cy5 según corresponda, el estándar interno marcado con Cy2 y el empalme de las 3 imágenes.

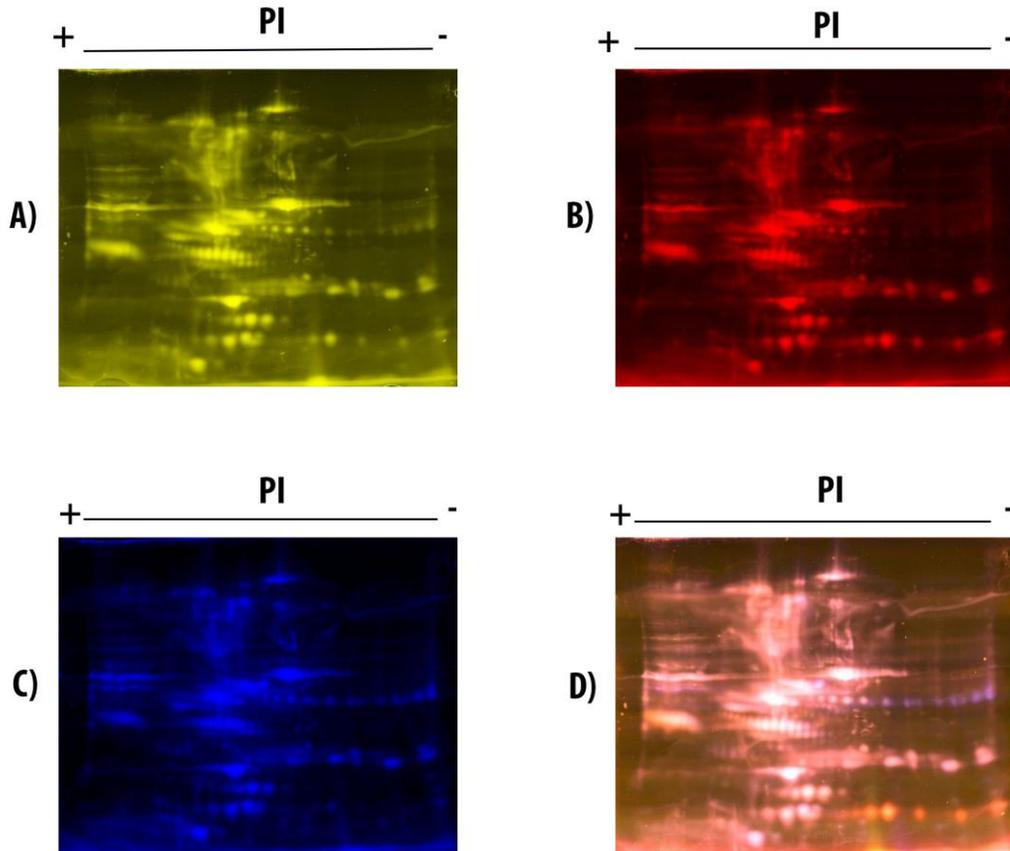


Figura 8. Perfil de proteínas de plasma P056 y P029 separados con 2D-DIGE. A) Imagen de estándar interno marcado con Cy2. B) imagen del plasma P056 con diagnóstico de ADGI, marcado con Cy3. C) Imagen del plasma P029 con diagnóstico de GC, marcado con Cy5. D) Imagen empalmada de los 3 geles. Geles con gradiente de concentración de 4-20% de acrilamida, 7cm, pH 3-10.

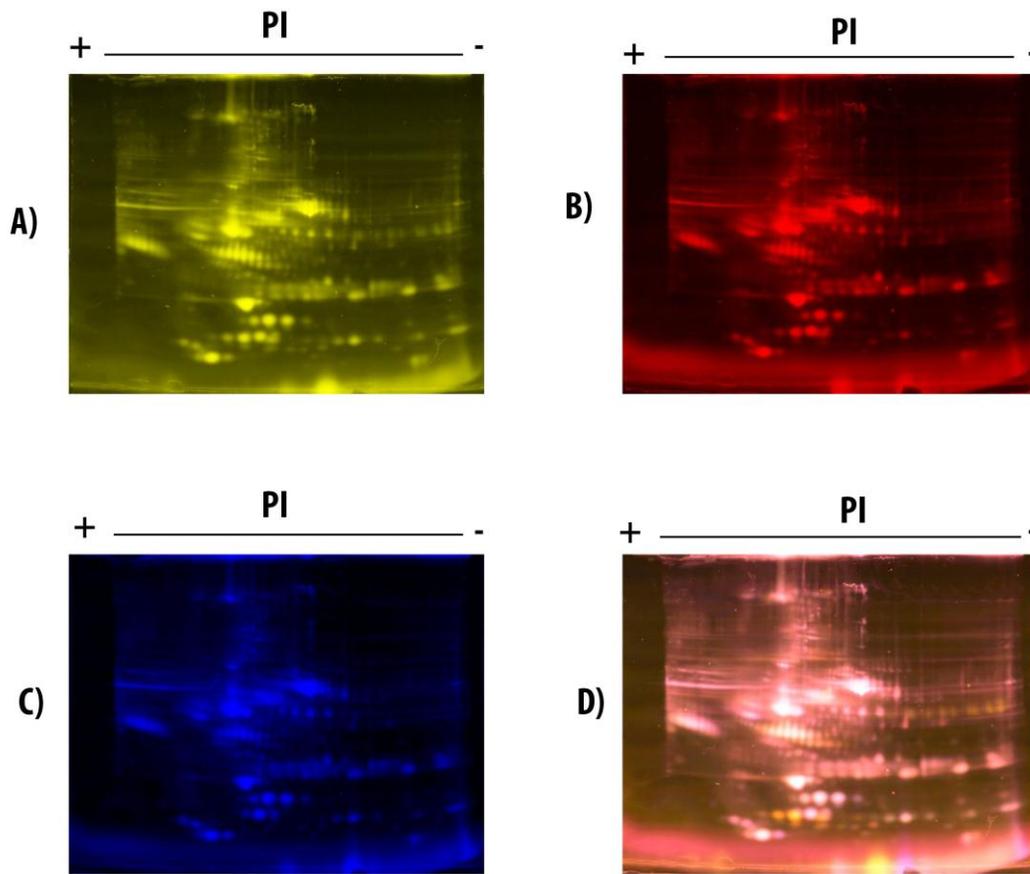


Figura 9. Perfil de proteínas de plasma P045 y P050 separados con 2D-DIGE. A) Imagen de estándar interno marcado con Cy2. B) imagen del plasma P045 con diagnóstico de GC, marcado con Cy3. C) Imagen del plasma P050 con diagnóstico de ACGI, marcado con Cy5. D) Imagen empalmada de los 3 geles. Geles con gradiente de concentración de 4-20% de acrilamida, 7cm, pH 3-10.

9. DISCUSIÓN

Durante varios años se han realizado esfuerzos para encontrar moléculas (genes o proteínas) que ayuden a identificar las diferentes etapas que se presentan a lo largo del cáncer gástrico, de tal manera que estas puedan ser utilizadas como biomarcadores de cada una de las lesiones, de tal forma que el cáncer se pueda diagnosticar de forma temprana. En diversos estudios biomédicos se ha demostrado que los niveles de proteínas del plasma reflejan un estado fisiológico o patológico y puede ser usado para el diagnóstico y pronóstico de algunas enfermedades⁴⁸. Como se describió en la sección de antecedentes de este trabajo, los avances que se han obtenido no han sido suficientes para lograr identificar biomarcadores del ACG. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo estuvo enfocado en identificar los perfiles de proteínas del plasma sanguíneo de pacientes con GC y ACGI infectados con *H. pylori*, con el fin de encontrar alguna diferencia en la expresión en alguna proteína entre ambos grupos.

Un aspecto importante de la metodología implementada en esta investigación es la depleción de proteínas abundantes en el plasma, como Albumina, Inmunoglobulinas, alfa-1- antitripsina, fibrinógeno y Haptoglobulinas, que pudieran interferir con la identificación de proteínas de baja expresión o de baja abundancia, que pudieran ser de interés para este tipo de investigación⁴⁹⁻⁵². Por lo que utilizamos un el kit Spin Trap (GE Healthcare) para eliminar Albumina e inmunoglobulinas, y que de acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 3, el uso de este kit se logró eliminar dichas proteínas de la muestra de plasma.

La muestra para ser marcada con los CyDye debe ser ajustada a un pH 8.5, este es un paso crucial debido a que si la muestra se encuentra en un pH menor a 8.5 el marcaje es ineficiente y si la muestra tiene un pH mayor a 8.5 el marcaje es inespecífico. Por lo que se realizaron diversas pruebas para ajustar el pH de nuestras muestras. Primeramente se siguieron las instrucciones del Manual de GE Healthcare para 2D-DIGE⁴⁶, el cual mencionaba que había que ajustar el pH con buffer de lisis e hidróxido de sodio 50mM o mayor, pero no se lograba ajustar la

muestra. Buscando en la literatura se encontró que se utilizaba un buffer de marcaje, el cual contenía 7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% w/v CHAPS, 10-20 mM Tris⁵³. Por lo que decidimos preparar una solución de Tris-Base 500mM ajustado a pH 9.5, de tal manera que la concentración final de Tris-base en la muestra de plasma disuelto en buffer de rehidratación quedara a 10mM, dicha concentración estaba en el rango mencionado por la literatura. Por lo que se determinó que 2 µl de Tris-Base pH 9.5 500mM es suficiente para ajustar a un pH de 8.5 un volumen de 100 µl de muestra de proteínas de plasma en Buffer de rehidratación, el cual tiene un pH de 6.6.

La cuantificación de proteínas es un punto crítico, ya que para hacer el 2D-DIGE es necesario colocar la misma cantidad de proteína. Por lo que era importante tener una curva estándar de BSA con un coeficiente de error mínimo de 0.99. Primeramente se empezó a utilizar el método descrito en el manual del kit 2D-Quant, sin embargo al realizar la curva estándar y leer en el espectrómetro cada alícuota perteneciente a la curva estándar, no se obtenía el coeficiente de correlación adecuado, por lo que se pensó que el tiempo de espera entre que se lee una alícuota y otra, provocaba que los valores de la absorbancia cambiaran. Por tal motivo se decidió leer en una placa de ELISA, en donde todas las alícuotas de la curva estándar y las muestras fueron leídas simultáneamente. De esta forma fue como se obtuvo una curva estándar con un coeficiente de error superior a 0.99. Lo cual no aseguraba que la concentración de proteínas se calculaba correctamente.

En la Figura 3 podemos observar la integridad de las proteínas, la eficiencia en la eliminación de albumina, así como una homogeneidad de todas las muestras. Un aspecto importante de la imagen es que la mayoría de las proteínas se encuentra en la parte central del gel (118-20 KDa). Aunque aparentemente hay pocas proteínas de peso molecular alto y pocas de bajo peso molecular, en la Figura 5 se muestra que cuando se incrementa la cantidad de proteína y se utiliza un gel de gradiente, así como un método de tinción más sensible se logran detectar varias

proteínas de bajo peso molecular, aunque la mayoría de las proteínas tienen un peso molecular intermedio.

Una etapa crítica es la eliminación de sales y otras sustancias que pudieran interferir en la separación de proteínas por punto isoeléctrico. De acuerdo a los resultados que se observaron en la estandarización del IEF, nos indica que el kit 2D clean Up no resulta ser tan eficiente, ya que al realizar el IEF con las condiciones recomendadas en otras investigaciones^{54, 55} y el manual de GE Healthcare⁵⁶ (protocolo 1), no se logró una buena separación debido a que la muestra aun contenía sales. Por lo que podríamos pensar que el protocolo estándar recomendado, no es eficiente para todas las muestras de proteínas, Por tanto se deben investigar las condiciones óptimas para cada tipo de muestra. Fue entonces que por recomendaciones de expertos del Instituto Nacional de Medicina Genómica se cambió el protocolo 1 por el mostrado en la

Tabla 2, el cual había sido utilizado en muestras de orina humana (que por naturaleza es abundante en sales). Con el cual se obtuvo un resultado favorable como se observa en la Figura 4 y Figura 5. Con respecto a la separación de proteínas por peso molecular inicialmente se siguieron las condiciones recomendadas por el manual de GE Helathcare, que han sido utilizadas en otros trabajos. La segunda dimensión se realizó primeramente en geles de acrilamida al 12.5% y la muestra era corrida a 80 V de corriente constante durante 4:30 horas. Sin embargo al visualizar las proteínas, notamos que la mayoría de ellas se quedaban en la parte superior del gel como se observa en la Figura 4. Debido a que las proteínas de alto peso molecular no permitían el paso de las demás proteínas. Por lo que se decidió utilizar geles pre hechos con gradiente de concentración de acrilamida 4-20% de la marca BIORAD, utilizando las condiciones de IEF del protocolo (

Tabla 2) y la electroforesis se llevó a cabo a 80 V de corriente constante. Sin embargo el tiempo de corrimiento fue diferente ya que se siguieron las instrucciones de la marca BIORAD, que decía que la corrida debía ser detenida cuando el frente de la muestra en color azul llegara a la marca final que el gel, por

tanto se estableció un tiempo de 2:30 horas de corrida. Al visualizar el gel, las proteínas se observaba en diversas secciones del gel, pero en la parte central se observaban la mayoría de las proteínas del plasma. Lo más notable es que se observaron proteínas que no podían visualizarse en un gel al 12.5% de acrilamida. De esta forma fue como se lograron estandarizar las condiciones para la electroforesis en 2D antes de realizar algún experimento de 2D-DIGE.

Comúnmente los análisis experimentales 2D dirigen a diversas preguntas como la diferencia en los niveles de proteína causada por un estado de enfermedad, un tratamiento médico, etc. Algunas diferencias en los niveles de proteínas estudiadas son pequeñas, y este resultado se ve afectado por: la variación experimental procedente del sistema como las diferencias entre las condiciones electroforéticas: diferencias entre las tiras en la primera dimensión, en los geles en la segunda dimensión, en las distorsiones del gel, en la variación en la aplicación de la muestra, en la variación de cada usuario, en la variación debido a la edición e interpretación del usuario cuando usa un software de análisis y en la variación biológica inherente que surge de las diferencias intrínsecas que se producen dentro de una población. Por ejemplo las diferencias entre individuos, entre plantas, entre cultivos etc., los cuales han sido sometidos a las mismas condiciones. Con la técnica 2D-DIGE es posible eliminar la variación experimental, ya que es un ensayo múltiple, que en un mismo gel puedes procesar 2 muestras incluyendo un estándar interno de ambas. El sistema Ettan DIGE es capaz de detectar y cuantificar diferencias muy pequeñas⁴⁶. Por lo anterior se decidió utilizar 2D-DIGE para identificar diferencias entre los perfiles de proteínas de pacientes con GC y ACGI. La mayoría de las investigaciones que se han realizado con esta técnica utilizan geles de 13, 18 o 24 cm, utilizando un cantidad de proteína de 50 µg (recomendado por el manual 2D-DIGE GE Healthcare), dicha cantidad de proteína es posible marcar con 400pmoles de CyDye^{46, 54} Debido a que este trabajo es un ensayo piloto, utilizamos geles de 7 cm, sin embargo se desconocía la cantidad de proteína que se debía colocar en el gel. Por tal motivo se hizo la búsqueda de trabajos realizados con ese tamaño de gel y encontramos

un trabajo que utilizaba geles de 7 cm, en el cual colocaron 10 µg de proteína y esta fue marcada con 80 pmoles de CyDye⁵⁵. Se decidió de hacer un ensayo de prueba para ver si la cantidad de proteína y la concentración de CyDye eran optimas, en la Figura 6 se observa el resultado obtenido donde el marcaje, la separación por punto isoeléctrico y peso molecular se realizaron de manera correcta. El patrón de proteínas que se observó es muy similar entre ellas (Figura 6 B y C) debido a que se procesaron 2 muestras de pacientes con GC, es decir presentan la misma patología. Posteriormente se realizó un ensayo con las mismas condiciones, utilizando una muestra con CG y otra con ACGI. En la Figura 7 (B y C) se observan pequeñas diferencias en el patrón de proteínas entre la muestra marcada con Cy3 y Cy5. Esto pudiera deberse a que las condiciones patológicas de ambas muestras son diferentes. Por último se realizó el ensayo final con las muestras seleccionadas para el análisis proteómico. De acuerdo a los resultados obtenidos como se observa en la Figura 8, el patrón de proteínas expresado presenta una diferencia en la expresión de proteínas en la muestra marcada con Cy3 (ACGI). En donde algunas proteínas en la parte inferior derecha se ven aumentada la expresión y en la sección media de lado derecho, la expresión de algunas proteínas se ve disminuida con respecto a la muestra marcada con Cy5 (GC). Esto se puede observar en la imagen empalmada (D) en donde el aumento de color rojo y azul según corresponde. En la Figura 9 se observan mínimas diferencias, que posiblemente con un software específico para esta técnica, pudieran identificarse un mayor número de spots de proteínas que pudieran expresarse diferencialmente.

La estandarización de esta metodología permitió obtener los perfiles de proteínas de los grupos estudiados (GC y ACGI), que incluye desde la preparación de la muestra, cuantificación, marcaje, isoelectroenfoque y electroforesis. Sin embargo el análisis se ve limitado debido a al tamaño de los geles, por lo que sería conveniente explorar en un tamaño mayor a 7 cm, en tiras con un gradiente de pH menor de 3-10, así como un rango de gradiente de concentración de acrilamida

menor de 4-20%. También sería importante utilizar un número mayor de muestras para que los resultados sean estadísticamente significativos.

10. CONCLUSIONES

- Se determinó la positividad a *H. pylori* de las muestras de utilizadas para el análisis proteómico.
- Se estandarizó la metodología 2D- DIGE, que incluye desde la preparación de la muestra, ajuste de pH, cuantificación de proteína, marcaje de la muestra, IEF y electroforesis.
- Se obtuvieron los perfiles de proteínas del plasma sanguíneo de los grupos de pacientes con gastritis crónica y Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal infectados con *H. pylori*.

11. PERSPECTIVAS

- Reducir el rango de pH DE 3-10 por un rango de 4-7 para mejorar la separación de proteínas.
- Reducir el gradiente de concentración 4-20%de acrilamida de los geles utilizados.
- Escalar la metodología a geles de, 13, 18 o 24 cm para poder hacer un mejor análisis de los perfiles de proteínas.
- Utilizar un número mayor de muestra para que los resultados sea estadísticamente significativos.

12. REFERENCIAS

1. GLOBOCAN. GLOBOCAN 2008. 2008; Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Salud SNdId. SINAIS 2008.
3. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001; 2:457-66.
4. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual review of pathology*. 2006; 1:63-96.
5. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. 2010; 23:713-39.
6. Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological reviews*. 2010; 90:831-58.

7. Nardone G, Morgner A. Helicobacter pylori and gastric malignancies. Helicobacter. 2003; 8 Suppl 1:44-52.
8. Correa P, Piazzuelo MB. The gastric precancerous cascade. Journal of digestive diseases. 2012; 13:2-9.
9. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. Gastroenterology. 2008; 135:91-9.
10. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, et al. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. Oncogene. 2007; 26:4617-26.
11. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. Science. 2003; 300:1430-4.
12. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, et al. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008; 105:1003-8.

13. Mueller A, Falkow S, Amieva MR. Helicobacter pylori and gastric cancer: what can be learned by studying the response of gastric epithelial cells to the infection? Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2005; 14:1859-64.
14. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori. Journal of medical microbiology. 1988; 26:93-9.
15. Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. Frontiers in microbiology. 2010; 1:115.
16. Miehlike S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T, Lehn N, Malfertheiner P, et al. The Helicobacter pylori vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. International journal of cancer Journal international du cancer. 2000; 87:322-7.
17. Torres VJ, VanCompernelle SE, Sundrud MS, Unutmaz D, Cover TL. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. J Immunol. 2007; 179:5433-40.

18. Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastroenterology clinics of North America. 1993; 22:89-104.

19. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium Helicobacter pylori leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. The Journal of clinical investigation. 1994; 94:4-8.

20. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, Falkow S. Induction of host signal transduction pathways by Helicobacter pylori. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997; 94:7595-9.

21. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. Nature reviews Microbiology. 2004; 2:747-65.

22. Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. The American journal of gastroenterology. 2010; 105:493-8.

23. Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. Current pharmaceutical design. 2003; 9:1499-528.

24. Lindberg P, Larsson A, Nielsen BS. Expression of plasminogen activator inhibitor-1, urokinase receptor and laminin gamma-2 chain is an early coordinated event in incipient oral squamous cell carcinoma. *International journal of cancer* *Journal international du cancer*. 2006; 118:2948-56.
25. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer treatment reviews*. 2008; 34:122-36.
26. Díez M, Mugüerza J, Martín A. Marcadores biológicos en adenocarcinomas gástricos. *Gastroenterología Integrada*. 2002; 3:229-41.
27. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World journal of surgery*. 1995; 19:484-8; discussion 9-90.
28. Cruveilhier J. Considérations générales sur les ulcérations folliculaires de l'estomac. *Atlas d'Anatomie Pathologique*. 1842; II.
29. Blanchard TG, Czinn SJ. Review article: Immunological determinants that may affect the *Helicobacter pylori* cancer risk. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 1998; 12 Suppl 1:83-90.
30. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, et al. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer*

epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2005; 14:1464-9.

31. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer research*. 1988; 48:3554-60.

32. Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Molecular and cellular biology*. 1994; 14:7340-51.

33. Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, et al. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. *Journal of gastroenterology*. 2002; 37:94-100.

34. T.Poon, P.Johnson. Application of Proteomics to the Discovery of Serological Tumor Markers. In: M. C, editor. *Handbook of proteomic Methods*. Totowa, New Jersey 2003. p. 331-45.

35. Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004; 286:G515-20.

36. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002; 4:449-60.
37. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*. 1998; 4:707-14.
38. Xia HH, Lam SK, Huang XR, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, et al. Helicobacter pylori infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor--by epithelial cells, T cells, and macrophages--in gastric mucosa. *The Journal of infectious diseases*. 2004; 190:293-302.
39. Xia HH, Yang Y, Chu KM, Gu Q, Zhang YY, He H, et al. Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Cancer*. 2009; 115:5441-9.
40. Qiu FM, Yu JK, Chen YD, Jin QF, Sui MH, Huang J. Mining novel biomarkers for prognosis of gastric cancer with serum proteomics. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2009; 28:126.
41. Liu W, Liu B, Cai Q, Li J, Chen X, Zhu Z. Proteomic identification of serum biomarkers for gastric cancer using multi-dimensional liquid chromatography and

2D differential gel electrophoresis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012; 413:1098-106.

42. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002; 1:845-67.

43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.

44. Biosciences A. 2-D Clean-Up Kit. 2002.

45. Healthcare G. 2-D Quant Kit. 2002-2009.

46. Healthcare G. Ettan DIGE System User Manual. AB ed2005.

47. Lepper PM, Moricke A, Vogt K, Bode G, Trautmann M. Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004; 11:569-76.

48. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*. 2006; 6:6326-53.

49. Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics*. 2003; 3:1980-7.
50. Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*. 2005; 5:307-17.
51. Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics*. 2005; 5:3304-13.
52. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2003; 2:262-70.
53. Heywood WE, Madgett TE, Wang D, Wallington A, Hogg J, Mills K, et al. 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. *Proteome science*. 2011; 9:56.
54. Rukmangadachar LA, Kataria J, Hariprasad G, Samantaray JC, Srinivasan A. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. *Clinical proteomics*. 2011; 8:4.

55. Manivannan B, Rawson P, Jordan TW, Secor WE, La Flamme AC. Differential patterns of liver proteins in experimental murine hepatosplenic schistosomiasis. *Infection and immunity*. 2010; 78:618-28.
56. Healthcare G. 2D- Electrophoresis Principles and methods. 2004. p. 168.

13. APENDICE DE RECTIVOS Y EQUIPO

REACTIVO	MARCA	CATALOGO
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Sigma-Aldrich	N6876-1G
Ácido acético	Reamex	
Acrilamida	USB	A9099
Agarosa	GibcoBRL	15517014
Anfolitos pH 3-10L	BIORAD	1632094
Anti-IgG Humana Fosfatasa Alcalina producida de cabra	Sigma-Aldrich	A1543-1ML
Bis-Acrilamida	USB	110269
CHAPS	ROCHE	70103120
Cloruro de Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich	B8503-1G
Cloruro de sodio	J.T. Baker	362505
Coomasie Blue G-250	Amiresco	6104581
CyDye DIGE Fluor minimal dyes 5nmol	GE Healthcare	25801083
DeStrek	GE Healthcare	17600319
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich	2207056
DTT	USB	153925GM
Fosfato de sodio	USB	20229
Glicerol	J.T. Baker	213601
Glicina	Invitrogen	15527013
Iodoacetamida	GE Healthcare	RPNG302V
kit 2D-Clean-Up	GE Healthcare	80648451
kit 2D-Quant	GE Healthcare	80648356
kit Albumin and IgG Depletion Spin trap	GE Healthcare	289480201
L- lysine	Sigma-Aldrich	L5501-5G
Leche Sveltyisin grasa	Nestle ®	
Metanol	J.T. Baker	904003
Persulfato de amonio	GibcoBRL	15523-012
peso molecular preteñido 118-20 KDa	Fermentas	SM0441
Plus One™ Dys strip Cover Fluid	GE Healthcare	17133501
SDS	GibcoBRL	15525017
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	Sigma-Aldrich	549421
TEMED	Sigma-Aldrich	T8133
Tiras pH 3-10 7cm	BIORAD	1632000
Tris-Base	Promega	HS131
Tris-HCl	USB	22676
Urea	USB	75826

EQUIPO	MARCA	CATALOGO
Camara de transferencia	BIORAD	1703930
Camara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BIO-RAD	165-8000
4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, IPG/prep well, 7 cm IPG strip/450 µl	BIORAD	456-1091
Ettan IPG Phor 3 Isoelectric Focusing	GE Heaalthcare	11003364
Lector de absorbancia	BIORAD	1681135
Microcentrifuga	Eppendorf	5415C
Thyphoon FLA-7000	GE Heaalthcare	28-9558-09
Transiluminado DigiDoc-It™	UVP	970246-01