

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Perfil proteómico de sueros de pacientes
Mexicanos con Diabetes tipo 2 en relación con su
índice de masa corporal**

Tesis que presenta

Erik Elvin Gómez Cardona

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2015



Constancia de aprobación de la tesis

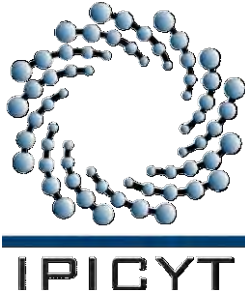
La tesis ***“Perfil proteómico de sueros de pacientes Mexicanos con Diabetes tipo 2 en relación con su índice de masa corporal”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Erik Elvin Gómez Cardona** y aprobada el **trece de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio Augusto Gordillo Moscoso
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Eric Edmundo Domínguez Hernández
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro: 297722) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 133 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 09:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dr. Eric Edmundo Hernández Domínguez	Secretario	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dr. Antonio Augusto Gordillo Moscoso	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Erik Elvin Gómez Cardona

sobre la Tesis intitulada:

Perfil proteómico de sueros de pacientes Mexicanos con Diabetes tipo 2 en relación con su índice de masa corporal

que se desarrolló bajo la dirección de

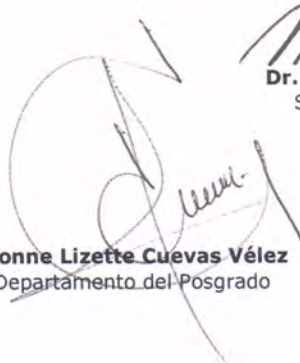
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 10:46 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2015.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Registro: 297722).

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) CONACYT-MEXICO GRANT 56787, INFRA-2013-01 No. 204373

Al Proyecto Programa de Estímulos a la Innovación (PEI) 2013-CONACyT, No. 197278.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al los doctores que forman parte de mi comité por su dedicación en la evaluación de mi trabajo.

A Alberto Barrera Pacheco por su apoyo técnico durante toda mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Proteómica (los que continúan y los que se fueron) por sus consejos y los momentos compartidos.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A Luis Padilla y René Arredondo por sus consejos y compañía durante esta etapa.

A mis amigos dentro y fuera del IPICYT.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del Acta de examen.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos	6
2.1. Criterios de inclusión y obtención de muestras	6
2.2. Toma de muestra de sangre	6
2.3. Cuantificación de péptidos relacionados a diabetes.....	6
2.4. Ensayo de actividad de la Dipeptidil peptidasa IV	7
2.5. Fraccionamiento y preparación de las muestras	7
2.6. Marcaje de las proteínas y electroforesis diferencial en geles 2D (DIGE)	8
2.7. Espectrometría de masas (MS).....	9
2.8. Análisis estadísticos y bioinformáticos	9
3. Resultados y discusión	11
3.1. Cuantificación de péptidos relevantes en la diabetes tipo II mediante un sistema de detección múltiple	11
3.2. Perfil proteómico de las fracciones de proteínas abundantes y poco abundantes de suero.....	15
3.3. Análisis de variación biológica de las proteínas de suero y análisis extendido de datos	20
3.4. Establecimiento del patrón de variación y agrupamiento.....	24
4. Referencias	31
5. Anexos	34

Lista de tablas

Tabla 1. Características generales del grupo control y los grupos de pacientes con diabetes.	7
Tabla 2. Combinaciones de muestras empleada para cada gel 2D en las diferentes fracciones de proteínas.	9
Tabla 3. Concentraciones séricas de algunos péptidos y proteínas asociados a diabetes.	13

Lista de figuras

Figura 1. Comparación de los perfiles electroforéticos de muestras de suero antes y después de la remoción de las catorce proteínas más abundantes	18
Figura 2. Imagen combinada del grupo control y los grupos de pacientes con diabetes tipo 2 de las proteínas poco abundantes y las proteínas abundantes.	20
Figura 3. Mancha diferencial en proteínas poco abundantes observado en el análisis de variación biológica	22
Figura 4. Clasificación de las proteínas diferenciales.	24
Figura 5. Representación gráfica mediante "Heat map" de las proteínas diferencialmente acumulada en la fracción de proteínas poco abundantes y abundantes.	26
Figura 6. Tendencias observadas para diferentes manchas y su asociación con variantes del estudio.	29

Resumen

Perfil proteómico de sueros de pacientes Mexicanos con Diabetes tipo 2 en relación con su índice de masa corporal.

La diabetes tipo 2 (DT2) es una crisis global de salud pública que amenaza la economía de todas las naciones, en particular los países en desarrollo. La diabetes es un problema de salud importante porque incrementa el riesgo de enfermedades cardíacas y complicaciones microvasculares como ceguera, falla renal u neuropatía periférica. La DT2 es el producto de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Algunos individuos son más propensos a desarrollar esta enfermedad que otros debido a diferencias en su fondo genético, por ejemplo las personas con ascendencia indigeno-mesoamericana tienen el doble de probabilidades que los individuos Europeos. La proteómica es una poderosa herramienta que permitirá descubrir biomarcadores relacionados a diabetes que a su vez tengan conexión con variables como obesidad, etnicidad, edad y género. Por esto, el objetivo del presente estudio fue analizar el perfil proteómico de suero de pacientes Mexicanos con diabetes en relación con su índice de masa corporal. Los pacientes se agruparon de acuerdo a su índice de masa corporal en las categorías: Normopeso, Sobrepeso, Obesidad I, Obesidad II/III y un grupo control de voluntarios sanos. Se colectaron muestras de sangre de todos los grupos y las proteínas abundantes de suero fueron removidas utilizando columnas de afinidad MARS14. Las proteínas abundantes y no abundantes fueron recolectadas para su marcaje con CyDye. Las proteínas fueron separadas en geles de 24 cm, los cuales fueron escaneados y analizados con el programa DeCyder 2D (v7.2). Las proteínas diferencialmente acumuladas fueron cortadas del gel preparativo, digeridas para su análisis por LC-MS/MS e identificadas utilizando la herramienta de búsqueda MASCOT (v2.5). Se definieron clusters con diferente comportamiento a través de los grupos de estudio y su tendencia fue relacionada a una variante del estudio (proteínas relacionadas a diabetes, obesidad o a ambas) Este estudio presenta evidencia de nuevas proteínas relacionadas a diabetes en suero que no habían sido previamente reportadas por el Proyecto de Proteoma de Diabetes Humano (HDPP), estas proteínas podrían estar relacionadas con las diferencias por etnicidad entre población Europea y Mexicana y representan candidatos a biomarcadores de la enfermedad.

Palabras clave: diabetes, obesidad, biomarcador, DIGE, suero, MAGPIX, electroforesis 2D.

Abstract

Serum proteomic profile of Mexican patients with Type-2 Diabetes in relation to their body mass index.

Type 2 diabetes (T2D) is a global public health crisis that threatens the economies of all nations, particularly developing countries. Diabetes is a major healthcare problem because it increases the risk of heart disease, stroke, and microvascular complications such as blindness, renal failure, and peripheral neuropathy. T2D is the product of the interplay between genetic and environmental factors. Some individuals may be more prone to develop type-2 diabetes, because differences in the genetic backgrounds, for example individuals of mesoamerican-indigenous ancestry have twice risk than those with European ancestry. Proteomics is a powerful tool that will help to find biomarkers related to diabetes that might have a connection with variables such as obesity, ethnic, age and gender. For this, the aim of the present study was to analyze the serum proteomic profile of Mexican patients with T2D grouped on their body mass index. Groups were defined according to the Body Mass Index of each patient into five categories: Normal weight, Overweight, Obese class I, Obese class II/III and one control group formed for healthy persons. Blood samples from all groups were collected under informed consent. Abundant serum proteins were depleted using MARS14 affinity columns. Abundant and non-abundant proteins were collected for labeling with Cy-fluorescent dyes for DIGE. Proteins were separated on 24 cm gels and scanned and analyzed with DeCyder 2D differential analysis software (v7.2). Differentially accumulated protein spots were cut from preparative gels, digested for LC-MS/MS analysis and identified using MASCOT (v2.5) search engine tool. Groups with different behavior through the groups were defined and its tendency was related to a variant on the study (Diabetes, Obesity or Diabetes-Obesity related protein). This work presents evidence of new diabetic related proteins in serum that has not been previously reported by the Human Diabetes Proteome Project (HDPP), those proteins might be related to the ethnicity differences between European and Mexican population and represent possible candidate biomarkers for the disease.

Keywords: diabetes, obesity, biomarker, DIGE, serum, MAGPIX, 2D electrophoresis.

1. Introducción

La proteómica ha tenido un impacto significativo sobre varias áreas de la investigación clínica, mejorando nuestra comprensión de la patogénesis de algunas enfermedades, la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el diseño de medicamentos y vacunas, así como el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico oportuno y la evaluación de la progresión de una enfermedad (Ray et al. 2011).

Los biomarcadores son biomoléculas que se utilizan para ayudar en el seguimiento de la progresión de la enfermedad, estos deben ser fácilmente detectables y cuantificables en cualquier población, y deben proporcionar información útil como la detección temprana de la enfermedad, la identificación de individuos de alto riesgo y el monitoreo de tratamientos farmacológicos (Zhang et al. 2013).

La determinación de los cambios en la abundancia de las proteínas en diferentes fluidos biológicos es un enfoque prometedor para un diagnóstico temprano de la enfermedad y puede contribuir como una estrategia complementaria a la histopatología (López et al. 2012). Aunque estos marcadores pueden ser prometedores la cantidad de marcadores identificados que lleguen a su aplicación clínica real, aún es un asunto a discutir (Ray et al. 2011). El cuello de botella en el desarrollo de biomarcadores se encuentra en reducir la lista de candidatos para encontrar aquellos que tengan buen desempeño y que merezcan el esfuerzo y el gasto para una validación completa (Rifai et al. 2006).

El desarrollo eficiente de biomarcadores puede ser alcanzado mediante una aproximación por fases, las cuales progresivamente pasan desde un enfoque centrado en la caracterización completa de las proteínas en una muestra mediante espectrometría de masas hasta un enfoque centrado únicamente sobre los candidatos de interés mediante ensayos de alta sensibilidad como inmunoensayos.

Esta aproximación por fases inician con el "Descubrimiento" el cual es un proceso semicuantitativo mediante el cual la expresión diferencial de proteínas específicas entre un estado sano y uno enfermo se define por primera vez. Esta

fase puede utilizar diferentes tipos de muestras provenientes de modelos de ratones, líneas celulares o material biológico humano y usualmente comprende un enfoque simple con una comparación entre muestras de la enfermedad y material sano. El principal resultado que genera esta fase es una lista con las proteínas diferenciales encontradas entre el estado normal y la enfermedad. Generalmente esta lista contiene de 20 a cientos de candidatos (Parker et al. 2014).

Todas las demás fases se enfocan a mediciones cuantitativas dirigidas a un blanco en particular. La segunda fase es la "Evaluación" que sirve para confirmar la expresión diferencial de un candidato. En esta etapa se utilizan métodos alternativos más específicos que ayuden a confirmar esta expresión diferencial en muestras de plasma o suero humano, en caso de que el descubrimiento fuera en otro fluido. En la fase de "Verificación", se reintroduce la variabilidad, cuidadosamente reducida en las fases anteriores, y el análisis se extiende a un mayor número de muestras de suero o plasma para poder evaluar las diferentes condiciones que pueden generar variabilidad en la población de prueba, por ejemplo variación genética, biológica, ambiental, dieta, tratamiento edad (Rifai et al. 2006).

Aquellos pocos candidatos a biomarcador que tienen una correcta verificación pasan a una "Validación" en la cual el ensayo final (comúnmente inmunoensayo) es probado en miles de muestras que reflejen perfectamente la variación de la población. La fase posterior implica la "Evaluación clínica" para traducir los resultados de la etapa pre-clínica hasta su aplicación en el área clínica en hospitales. En contraste con las fases previas, aquí se realizan estudios prospectivos con sujetos recién diagnosticados. El principal objetivo de esta fase es desarrollar hasta su forma final los ensayos para los biomarcadores cumpliendo los requerimientos clínicos. Al final existe una fase que considera el "Control de la enfermedad" que nos permite conocer el impacto del biomarcador identificando dificultades de implementación en práctica y costos/beneficios (Surinova et al. 2010).

Algunos ejemplos de un desarrollo exitoso son la proteína de suero humana CRP, comercializada por Dade Behring, para la predicción de enfermedades

cardiovasculares, la proteína troponina T, de la empresa Roche Diagnostics, utilizada para evaluar daño al miocardio, el péptido natriurético cerebral (BNP) utilizado para evaluar la severidad de una falla cardíaca (Parker et al. 2014), el antígeno específico prostático Pro2PSA para diferenciar cáncer prostático de tumores benignos, CA125 empleado en el diagnóstico de cáncer de ovario, el receptor de estrógeno en pruebas para cáncer de mama (Pusch et al. 2003) y un ejemplo interesante es OVA1 que es una prueba de diagnóstico descubierta por proteómica que se basa en un panel de proteínas (Transtiretina, Apolipoproteína-A1, Beta-2-Microglobulina, Transferrina y CA-125) que ayuda a la identificación de tumores malignos de ovario (Surinova et al. 2010).

El perfil de proteínas de sangre es uno de los análisis más complejos del proteoma humano, ya que el contenido de las proteínas varían en función de las condiciones fisiológicas y patológicas del individuo. La porción líquida de la sangre se conoce como plasma, y la eliminación del fibrinógeno y otros factores de coagulación da como resultado el suero. El suero es una muestra biológica ideal que contiene un gran cantidad de información debido a la variedad de proteínas liberadas por todos los tejidos y células como resultado de la secreción o fugas, algunas proteínas intracelulares también pueden ser liberadas durante la necrosis o apoptosis. Por estas razones el proteoma del suero ha ganado un interés considerable para el descubrimiento de biomarcadores enfermedad ya que proporciona una representación del estado fisiopatológico de un individuo y por el hecho de que es una muestra poco invasiva y de relativamente fácil acceso (Issaq et al. 2007).

A pesar de estas ventajas, el análisis del proteoma del suero es complicado debido a que presenta varios retos: a) el amplio rango dinámico de las proteínas, b) el efecto de enmascaramiento que dificulta la búsqueda de proteínas de baja abundancia debido a la presencia de proteínas de alta abundancia, c) los niveles altos de sales y otros compuestos que pueden interferir en el análisis y d) la gran variabilidad entre individuos (Ray et al. 2011, Röcken et al. 2004).

Trabajar con humanos se considera como un caso de alta heterogeneidad con importantes variables biológicas que dificultan el descubrimiento y el

establecimiento del "estándar de oro" en los biomarcadores de suero que se pueden aplicar a toda la población en general (Parker et al. 2014).

Una estrategia que facilita el trabajo de sueros en la etapa de descubrimiento de biomarcadores es trabajar con mezclas de sueros, ya que de esta forma se reduce la variación entre individuos, esta alternativa es recomendada cuando el interés de un estudio se enfoca a cambios en toda una población, para casos particulares por paciente se debe analizar su caso individual en fases avanzadas del desarrollo de marcadores (Diz et al. 2009). Mezclas homogéneas minimizan las diferencias individuales en la concentración de proteínas y en abundancia relativa de proteínas, resaltando los cambios debidos al estado fisiopatológico (Sadiq et al. 2008). Esta estrategia es una opción viable debido a que los procedimientos de proteómica, como geles 2D, son largos y es técnicamente limitante pensar en realizar estas técnicas para cada individuo de un estudio (Diz et al. 2009).

La identificación de biomarcadores de proteínas es útil para la detección temprana de diversas enfermedades mortales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades metabólicas que tiene un impacto significativo en la salud humana (Byrne et al. 2009). Generalmente, los trastornos metabólicos ocurren cuando procesos ordinarios se ven interrumpidos si algún órgano como el intestino, hígado, páncreas o tejido adiposos, se enferma o no funciona adecuadamente (Di Girolamo et al. 2012).

Según la OMS, la prevalencia de los trastornos metabólicos, especialmente la diabetes, está incrementando en todo el mundo, llevando a un aumento del riesgo de complicaciones cardiovasculares, que representa una de las principales causas de muerte en el mundo. La diabetes mellitus es una alteración metabólica de múltiples etiologías caracterizada por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos; resulta de un defecto en la secreción de la insulina por las células β pancreática, disfunción en su acción o ambas. En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. La OMS considera que junto con la obesidad podría alcanzar proporciones epidémicas y causa 4.6 millones de muertes por año o su equivalente una muerte cada siete

segundos. En México, se ha estimado que 10.6 millones de personas sufren de diabetes y sus complicaciones (Pérez-Fuentes et al. 2014).

La diabetes tipo 2 (DMT2) es la forma más común de la enfermedad (90% de la población diabética), está influenciada por factores como: estilo de vida, edad, embarazo, obesidad y tiene un fuerte componente genético. Este padecimiento incrementa el riesgo de enfermedades cardiacas, infartos y complicaciones microvasculares como ceguera, falla renal (nefropatía diabética) y neuropatía periférica (Ashcroft et al. 2012).

Se ha visto que individuos con ascendencia nativa mesoamericana son 2 veces más susceptibles a ser diagnosticados con DMT2 que los individuos con ascendencia Europea. Posiblemente debido a la gran variación en el fondo genético derivado de la mezcla de los grupos indígenas Mexicanos, los Europeos y Africanos del oeste (contribución 65, 30 y 5% respectivamente) (Ascencio-Montiel et al. 2013, Barquera et al. 2013). Estudiar el proteoma de esta población puede permitir identificar las proteínas que favorecen esta predisposición por etnicidad. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue obtener el perfil proteómico de suero de pacientes mexicanos diagnosticados con DMT2 con diferentes índices de masa corporal como fase de descubrimiento de biomarcadores de la enfermedad y como estrategia de evaluación de proteínas que varían por la existencia de obesidad como enfermedad relacionada a diabetes.

2. Materiales y métodos

2.1. Criterios de inclusión y obtención de muestras

Se reclutaron en el estudio, bajo la aprobación de la clínica Pedro Bárcena Hiriart- ISSSTE-SLP, pacientes mexicanos con diabetes, tanto hombres como mujeres, quienes tenían al menos 5 años de haber sido diagnosticados con la enfermedad, que consumían hipoglucemiantes orales y que no presentaran problemas hepáticos, renales o cardiovasculares, ni empleaban insulina. Se incluyeron también muestras colectadas en la misma clínica de voluntarios sanos que accedieron a participar en el estudio y que tuvieran valores normales de glucosa y tuvieran normopeso.

2.2. Toma de muestra de sangre

Se colectaron muestras de sangre (bajo consentimiento informado) en tubos sin ningún anticoagulante y se separó el suero mediante centrifugación a 300 \times g por 20 min y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los individuos en el estudio se subdividieron de acuerdo a su índice de masa corporal en cuatro categorías: Normopeso (NP), Sobrepeso (SP), Obesidad I (Ob I) y Obesidad II/III (Ob II/III); también fue incluido un grupo control de voluntarios sanos, algunas características antropométricas se presentan en la Tabla 1. Para el estudio del perfil de proteínas se generaron mezclas de suero para cada uno de los grupos mencionados las cuales se usaron en todas las pruebas.

2.3. Cuantificación de péptidos relacionados a diabetes

Se realizó una cuantificación múltiple para detectar las concentraciones de algunos péptidos que se encuentran relacionados con Diabetes (Péptido C, Ghrelina, Polipéptido inhibidor gástrico (GIP), Péptido tipo glucagón 1 (GLP-1), Insulina, Leptina, inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), Resistina y Visfatina) utilizando una prueba optimizada para muestras de suero BIOP-PLEX Pro Diabetes Assays (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) en el lector múltiple Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y analizadas el mismo día para minimizar la variación. El proveedor incluyó

controles que fueron utilizados para seguir la variación entre corrida y las curvas de calibración, presentando coeficientes de variación menores al 10% y para poder determinar la concentración de los péptidos en pg/mL.

Tabla 1. Características generales del grupo control y los grupos de pacientes con diabetes.

Grupo	n	Edad (años)	Mujeres/Hombres	Proteína total (mg/mL)
Control	23	39.1 ± 10.6	10/13	73.8 ± 0.9
Diabéticos Normopeso	15	62.6 ± 7.7	10/5	67.4 ± 4.9
Diabéticos Sobrepeso	22	56.0 ± 5.9	12/10	73.7 ± 3.3
Diabéticos Obesidad I	13	57.1 ± 7.9	7/6	66.6 ± 0.4
Diabéticos Obesidad II/III	12	59.5 ± 7.6	11/2	64.6 ± 2.0

2.4. Ensayo de actividad de la Dipeptidil peptidasa IV

La actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) se analizó por triplicado para cada uno de los grupos de trabajo. Se utilizó un ensayo de monitoreo continuo en lector de microplaca a 405 nm por 3 h con lecturas cada 3 min a una temperatura fija de 25°C. Para el ensayo se mezclaron en cada pozo 5 µL de suero con 45 µL de buffer de prueba (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6) y 50 µL del sustrato a una concentración Gly-Pro-p-nitroanilide tosylate 1 mM (Gly-Pro-PNA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La actividad de la enzima fue calculada a 30 min y expresada en nmol/mL/min (U/L) de Gly-Pro-PNA hidrolizado.

2.5. Fraccionamiento y preparación de las muestras

Se realizó un fraccionamiento del suero empleando el sistema de remoción múltiple por afinidad en Columna MARS Hu-14 4.6 mm x 100 mm (Agilent Technologies, San Diego, CA, EUA), el cual selectivamente remueve en un solo paso las 14 proteínas más abundantes de suero (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, alfa2-macroglobulina, alfa1-glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína AI y AIII, factor C3 del complemento y transtiretina).

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para cada muestra, se colectó la fracción con las proteínas abundantes de suero (E14) y la fracción enriquecida en las proteínas menos abundantes (FT14). La muestra se concentró utilizando concentradores con PM de corte de 5000 Da (Agilent Technologies, San Diego, CA, EUA) y se intercambiando el buffer por Tris-HCl 10 mM pH 7.4 suplementado con el coctel inhibidor de proteasas Complete (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). La concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) utilizando BSA como estándar.

2.6. Marcaje de las proteínas y electroforesis diferencial en geles 2D (DIGE)

El perfil proteómico de las fracciones FT14 y E14 de sueros se generó utilizando la técnica DIGE incluyendo por gel muestra del estándar interno, del grupo control y de los pacientes con diabetes, empleando 50 µg de proteína respectivamente, para un marcaje mínimo con cada colorante Cy2, 3 y 5 (CyDye DIGE Fluors, GE Healthcare). Cada CyDye fue reconstituido en DMF anhidro y combinado con las muestras en una relación de 400 pmol de CyDye por cada 50 µg de proteína. El marcaje se realizó en hielo por 35 min en la oscuridad y la reacción fue detenida por incubación con 1 µL de Lisina 10 mM en hielo por 10 min en la oscuridad. El estándar interno correspondió a una mezcla a partes iguales de cada una de las muestras en el estudio, esto con la finalidad de poder realizar comparaciones entre imágenes provenientes de diferentes geles.

Las proteínas marcadas (estándar, control y pacientes) fueron combinadas de acuerdo a la información presentada en la Tabla 2. Adicionalmente 1 mg de proteína sin marcar del estándar interno fue procesada por separado mediante electroforesis 2D como gel preparativo teñido con Coomassie Blue para fines de identificación. Para el caso de la fracción FT14 se realizó un isoelectroenfoco en tiras de 24 cm con gradiente lineal de pH 4-7 (ReadyStrip IPG Strip, Bio-Rad) y para la fracción E14 se utilizaron tiras de 13 cm con gradiente lineal de pH 4-7 Immobiline DryStrip (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Una vez enfocadas, las

tiras fueron equilibradas en buffer con Tris-HCl 50 mM, Urea 6M, 30% de Glicerol y 2% de SDS para mantener el estado reducido de las proteínas. La separación en segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida empleando el sistema Ettan DALTsix. Los geles resultantes fueron escaneados y las imágenes fueron cargadas en el software DecyDer v7.2 (GE-Healthcare, Uppsala, Suecia).

Tabla 2. Combinaciones de muestras empleada para cada gel 2D en las diferentes fracciones de proteínas.

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 1	Estándar Interno	Diabéticos Normopeso	Control
Gel 2	Estándar Interno	Control	Diabéticos Obesidad II/III
Gel 3	Estándar Interno	Diabéticos Obesidad I	Diabéticos Sobrepeso
Gel 4	Estándar Interno	Control	Diabéticos Obesidad I
Gel 5	Estándar Interno	Diabéticos Sobrepeso	Control
Gel 6	Estándar Interno	Diabéticos Obesidad II/III	Diabéticos Normopeso

2.7. Espectrometría de masas (MS)

Las proteínas diferenciales identificadas entre los grupos de estudio fueron escindidas del gel preparativo. Las manchas de proteínas fueron desteñidas, reducidas y alquiladas y digeridas con tripsina para la posterior identificación de los péptidos generados. Los péptidos se separaron mediante cromatografía líquida de ultra presión (UPLC Nano-Aquity, Waters, Milford, MA, EUA) y se sometieron a una ionización por electrospray para su análisis en un espectrómetro de masas (ESI-QUAD-TOF) para obtener la masa carga de cada péptido.

2.8. Análisis estadísticos y bioinformáticos

Los análisis de la cuantificación de péptidos relevantes en diabetes se realizó por triplicado, los valores fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Diferencias significativas entre los grupos con diabetes vs el control fueron determinadas utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA) y para

cada caso en particular se empleo una prueba t de student. Los resultados fueron considerados significativos si el valor de $p < 0.05$. El programa utilizado para las comparaciones estadísticas fue GraphPad Prism 6.0.

Los datos obtenidos por MS se utilizaron para identificar las proteínas con ayuda del servidor MASCOT (Matrix Science v2.5). La búsqueda se realizo contra la base de datos de humano en SwissProt ingresando los valores de m/z obtenidos por MS empleando los siguientes parámetros: Masa de la proteína: Sin restricción; Número máximo de cortes no realizados: 1; Modificaciones fijas: Carbamidometilación (C); Modificaciones fijas: Oxidación (M); Tolerancia de la masa de los péptidos: ± 10 ppm; Tolerancia de la masa de los fragmentos: ± 0.05 Da y ± 0.1 Da para la fracción E14 y FT14 respectivamente. La tolerancia en las proteínas poco abundantes se incrementó debido a la menor intensidad de las manchas y de esta forma se favorece la identificación. Las identificaciones fueron consideradas significativas si el registro tenía una puntuación (score) mayor al definido, a una $p < 0.05$, para considerar que la probabilidad de que el alineamiento observado sea un evento al azar.

Se utilizó el programa DeCyder 2D v7.2 (GE Healthcare) para los análisis de variación biológica (BVA) donde se compara la abundancia relativa de las proteína en los geles, así como el análisis extendido de datos (EDA) para la generación de grupos con patrones similares de regulación en las diferentes muestras. Las diferencias significativa en la cantidad de proteína fue determinada mediante ANOVA y de manera individual mediante una prueba de comparación múltiple ambas pruebas incluidas en el paquete estadístico del programa. Se consideró que existía una abundancia diferencial significativa si el valor de $p < 0.05$ para la fracción FT14 y $p < 0.01$ para la fracción E14. El valor de p es menor para fracción E14 para compensar la mayor variabilidad en los geles.

Adicionalmente las proteínas identificadas fueron clasificadas en diferentes categorías de acuerdo a su función molecular y al proceso biológico en el cual participan de acuerdo a la información contenida en Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

3. Resultados y discusión

3.1. Cuantificación de péptidos relevantes en la diabetes tipo II mediante un sistema de detección múltiple

La técnica MAGPIX es un sistema exacto y válido para la detección de múltiples marcadores en una sola medición, permitiendo detectar hasta 50 moléculas en un volumen muy pequeño de muestra (Albrecht et al. 2013), en nuestro caso se utilizó para analizar los cambios de diez marcadores relacionados a la DT2 en pacientes. Adicionalmente para complementar la información de los marcadores cuantificados, se determinó la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en las muestras de suero. La Tabla 3 presenta el resumen de los resultados obtenidos.

Las hormonas incretinas, GIP y GLP-1, son secretadas por el intestino delgado en respuesta a la ingesta de alimentos y actúan sobre receptores específicos en las células β pancreáticas estimulando la secreción de insulina dependiente de glucosa. GIP promueve formación de hueso, induce saciedad y estimula incorporación de ácidos grasos. GLP-1 es un factor importante en la homeostasis de glucosa, inhibe la secreción de glucagón, reduce el vaciado gástrico y favorece la saciedad (Drucker et al. 2006). Para el caso de las incretinas se esperaba que existieran valores menores a los que presenta el grupo control pues se sabe que la enzima encargada de su degradación, la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) tiene una actividad incrementada en pacientes con diabetes (Mannucci et al. 2005), esta disminución solo se observó para GIP en los grupos con normopeso y obesidad I (NP y Ob I, respectivamente). Contradictoriamente en algunos casos incluso existió un aumento para GIP y GLP-1 para los grupos de Ob II/III y SP-Ob I respectivamente. Para conocer si este comportamiento se debía a la enzima DPPIV se midió su actividad y se encontró que estaba reducida en los grupos NP, SP y Ob II/III; esto coincide con lo previamente reportado por Firneisz y et al. (2010) quienes reportaron que los pacientes con diabetes tipo 2 presentaban valores reducidos de la actividad de DPPIV respecto a un grupo de voluntarios sanos.

Tabla 3. Concentraciones séricas de algunos péptidos y proteínas asociados a diabetes.

Marcador	Control	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad I	Obesidad II/III
Péptido C	10217.85 ± 175.98	8472.17 ± 228.41 p< 0.0001	11728.15 ± 289.81 p< 0.0001	12656.58 ± 311.99 p< 0.0001	16711.35 ± 284.10 p< 0.0001
Ghrelina	360.18 ± 7.12	393.23 ± 11.78 p=0.0006	552.61 ± 12.63 p< 0.0001	329.79 ± 11.92 p=0.0012	287.14 ± 4.57 p< 0.0001
GIP	61.18 ± 2.44	45.88 ± 0.51 p< 0.0001	59.10 ± 1.58 p=0.1487	43.10 ± 1.15 p< 0.0001	94.01 ± 4.08 p< 0.0001
GLP-1	93.04 ± 1.86	92.36 ± 3.87 p> 0.7134	139.54 ± 2.73 p< 0.0001	98.93 ± 5.22 p= 0.0477	92.02 ± 2.29 p> 0.4581
Glucagón	66.77 ± 0.73	66.12 ± 0.92 p= 0.2550	122.07 ± 2.87 p< 0.0001	68.35 ± 1.45 p=0.0618	70.98 ± 1.34 p= 0.0002
Insulina	94.65 ± 3.52	59.89 ± 3.36 p< 0.0001	160.63 ± 5.68 p< 0.0001	144.86 ± 15.46 p< 0.0001	212.27 ± 9.68 p< 0.0001
Leptina	2505.40 ± 72.41	1717.80 ± 37.88 p< 0.0001	2698.19 ± 65.92 p=0.0023	3987.64 ± 108.18 p< 0.0001	6482.09 ± 223.01 p< 0.0001
PAI-1	8591.60 ± 397.87	9104.49 ± 127.06 p=0.02715	12302.52 ± 509.07 p< 0.0001	10149.56 ± 221.81 p< 0.0001	12323.12 ± 838.13 p< 0.0001
Resistina	1471.48 ± 45.20	1384.21 ± 40.17 p=0.0120	1664.51 ± 69.73 p= 0.0008	1162.9 ± 41.41 p< 0.0001	1722.82 ± 47.79 p< 0.0001
Visfatina	882.49 ± 37.29	874.95 ± 12.58 p> 0.6805	2190.24 ± 54.21 p< 0.0001	950.26 ± 25.07 p=0.0097	1798.79 ± 62.42 p< 0.0001
DPPIV	34.93 ± 1.44	26.92 ± 1.67 p= 0.0033	29.91 ± 0.26 p= 0.0040	33.75 ± 1.27 p= 0.3463	30.68 ± 1.18 p=0.0166

GIP= Polipéptido inhibitor gástrico; GLP-1= Péptido tipo glucagón 1; PAI-1= Inhibidor del activador de plasminógeno DPPIV= Dipeptidil peptidasa IV. Promedio de tres replicas ± DE. En negritas se marcan aquellos casos donde hay una diferencia significativa respecto al control.

No existió correlación entre la concentración de incretinas y el grado de obesidad ni con la actividad de DPPIV, reforzando la idea de que la medición de la actividad de DPPIV en plasma no necesariamente refleja el grado de degradación de las hormonas incretinas *in vivo* (Gunnarsson et al. 2009).

El péptido C cuenta con 31 aminoácidos y conecta las cadenas A y B de la insulina en la molécula de proinsulina. Su concentración generalmente correlaciona con los niveles de insulina en sangre y se ha considerado que puede ser un péptido bioactivo con funciones endócrinas (Landreh et al. 2013). En este estudio se observaron diferencias significativas en los niveles de péptido C, encontrándose concentraciones menores en los pacientes con NP y valores mayores en el resto de los grupos, esto correlaciona con los valores observados para la insulina donde se observó el mismo comportamiento. En este estudio el incremento en ambas moléculas es un proceso que no necesariamente es mediado por incretinas pues estas no se encontraron incrementadas.

El glucagón es un polipéptido de 29 aminoácidos, es la hormona que actúa de manera antagónica a la insulina, es secretado cuando la concentración de glucosa en plasma es baja, actúa como el regulador clave del metabolismo en condiciones de ayuno (Wilcox et al. 2005). Encontramos un incremento significativo en la concentración glucagón en los grupos SP y Ob II/III, el cual no se relaciona con la concentración de GLP-1, pues esta hormona no presentó disminución en su concentración respecto al control. Al igual que insulina el aumento observado en este estudio para glucagón podría ser independiente de la acción de las incretinas.

La leptina puede funcionar como parte de una vía de señalización que actúa en la regulación del tamaño de los depósitos de grasa, actúa directa o indirectamente en el sistema nervioso central para inhibir la ingesta de alimentos y regular el gasto energético como parte de un mecanismo de homeostasis para mantener la masa adiposa (Ma et al. 2015). La ghrelina se une a la leptina y juntas activan a la serin/treonin proteína quinasa RAC-alfa (AKT1), regulando muchos procesos incluidos el metabolismo, la proliferación, la supervivencia celular, el crecimiento y la angiogénesis (Goetze et al. 2002). La Leptina y AKT actúan sobre

la Resistina, hormona que suprime la habilidad de la insulina para estimular la captación de glucosa en adipocitos, lo cual representa una posible conexión entre obesidad y diabetes (Steppan et al. 2001). Los niveles de Ghrelina y Resistina presentaron comportamientos muy variables en los diferentes grupos, es posible que existan otros factores diferentes a diabetes y obesidad que hagan variar drásticamente sus concentraciones. Por ejemplo, se ha visto que los niveles de resistina, que incrementan en pacientes con DT2, dependen de la edad y la regulación nutricional (Gharibeh et al. 2010). Pero para el caso de la leptina si se observo un incremento significativo proporcional al grado de obesidad.

La Resistina induce la expresión de la Serpina E1, que es un inhibidor de las serín proteasas que actúa como blanco para el activador de plasminógeno tisular que en conjunto con el factor activador de plasminógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), la vitronectina y la uroquinasa del activador del plasminógeno actúan en el principal punto de control en la regulación de la fibrinólisis (Ikeda et al. 2014). PAI-1 es una glicoproteína que puede tener un papel importante en patologías del sistema inmune y en la respuesta inflamatoria. Es un importante inhibidor del sistema de fibrinólisis, por lo que niveles elevados de PAI-1 podrían suprimir el proceso de degradación, resultando en un incremento en el riesgo de trombosis (Juhan et al. 1991). Se encontraron valores incrementados de esta molécula en los grupos con diabetes.

Para el caso de la visfatina, es considerada como una adipocina que actúa como una citocina proinflamatoria capaz de inducir TNF- α e IL-6 (Luk et al. 2008). En este estudio los niveles de Visfatina estuvieron elevados en los grupos SP, Ob I y Ob II/III de pacientes con diabetes, esto coincide con lo reportado por Brown (2010) que menciona que los niveles circulantes de esta molécula son elevados en obesidad, DT2 y enfermedades aterotrombóticas y sugiere a esta proteína como un prometedor blanco terapéutico en enfermedades cardiovasculares relacionados al metabolismo, ya que puede directamente incrementar la secreción de insulina en las células β .

3.2. Perfil proteómico de las fracciones de proteínas abundantes y poco abundantes de suero

La proteómica clínica se ha beneficiado de las diversas técnicas de fraccionamiento y de las metodologías de detección, que evolucionan para manejar la complejidad y el rango dinámico de concentraciones de proteína en muestras de suero.

Las técnicas de fraccionamiento en fase sólida para extraer un grupo particular de proteínas puede realizarse con diferentes estrategias de remoción como: unión ligandos-colorantes, uniones por anticuerpos, por quelación de metal-ligando y por intercambio iónico (Chromy et al. 2004).

Al aplicar estas metodologías, por ejemplo utilizando anticuerpos contra las proteínas abundantes de suero, existe la posibilidad de eliminar pocas de las proteínas de baja abundancia junto con la proteínas abundantes debido a una captura no específica, esto podría resultar en la pérdida de información potencialmente importante, incluyendo posibles biomarcadores (Lopez-Villar et al. 2015) por esta razón se decidió analizar ambas fracciones para conocer el panorama completo de un los pacientes con DT2.

El abordaje proteómico inicial para separar, comparar y detectar cambios en los niveles proteínas (biomarcadores) y obtener los patrones de expresión que están relacionados con la enfermedad es la electroforesis en gel de dos dimensiones (2-DE) seguido de la identificación de proteínas mediante MS. La electroforesis 2D convencional permite la resolución de entre 3000 a 10000 proteínas, tiene una sensibilidad que va del rango de micro a nanomolar y nos da información sobre la cantidad relativa, solubilidad, masa molecular y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas (Byrne et al. 2009, Röcken et al. 2004).

Como resultado de los geles 2D, la eliminación de las proteínas abundantes en suero mejoró la resolución de dos maneras: permitió la visualización de las proteínas que co-migran con las proteínas abundantes y mediante el aumento de la carga de proteínas menos abundantes. En la Figura 1 se puede observar la mejoría en la resolución de la muestra tras el fraccionamiento de proteínas de suero y se muestra como la cantidad de bandas (1D) y spots (2D) observados

posterior al proceso de fraccionamiento incrementa con respecto al suero completo, esta mejoría en el patrón es consistente con lo reportado por Björhall et al. (2005).

La electroforesis 2D convencional presenta problemas debido a la alta variación entre los geles por diferencias a causa de la corrida, la detección y cuantificación de proteínas. Por esta razón es necesario buscar variantes a la técnica que mejoren la reproducibilidad y sensibilidad de la detección de las proteínas. Una opción es la electroforesis diferencial en geles 2D (DIGE) esta variante de electroforesis 2D con marcaje fluorescente mejora la sensibilidad y reduce la cantidad de muestra requerida (50 μg de proteína por muestra comparado con las técnicas convencionales las cuales usan alrededor de 1 mg de proteína por muestra) (Alban et al. 2003). En nuestro caso la reducción de la cantidad de muestra requerida fue muy conveniente por el tipo de muestra en estudio pues la cantidad de proteínas poco abundantes de suero era limitante. Los colorantes utilizados son espectralmente diferenciables por lo que las muestras marcadas con diferente CyDye se pudieron correr en el mismo gel y ser detectadas a diferentes longitudes de onda, gracias a esto la reproducibilidad se vio mejorada y la comparación fue más sencilla ya que no existía el problema de variación en corrida para cada muestra.

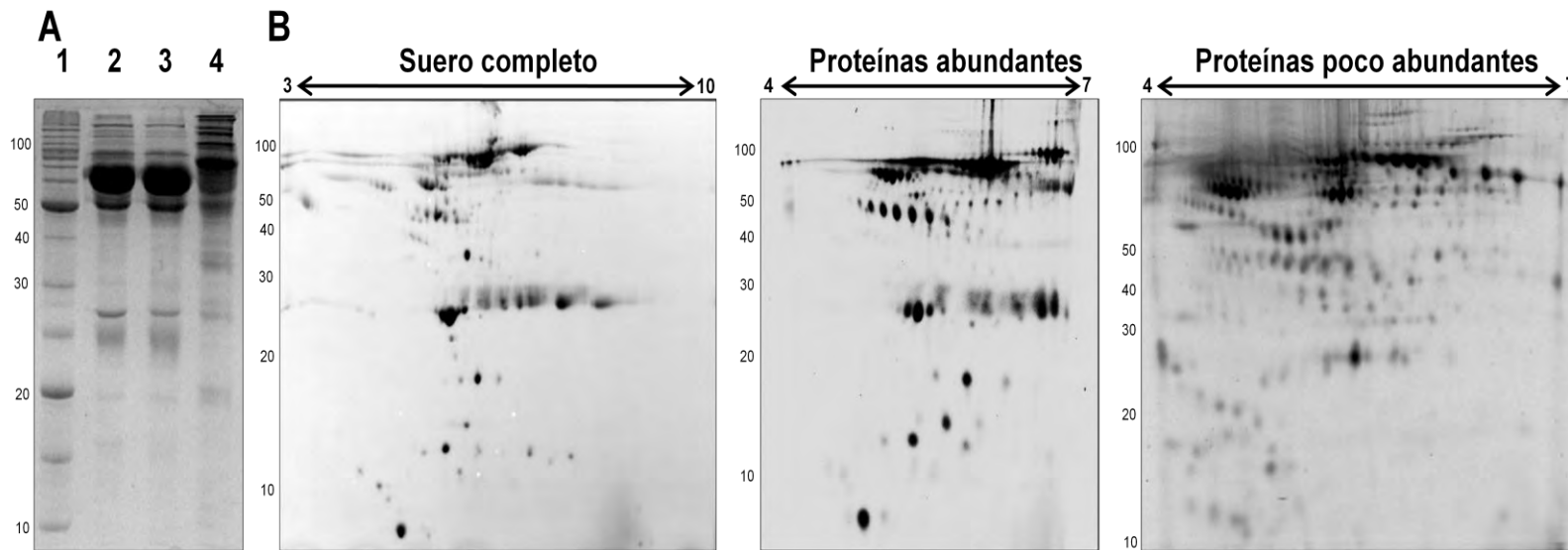


Figura 1. Comparación de los perfiles electroforéticos de muestras de suero antes y después de la remoción de las catorce proteínas más abundantes. A. Perfil 1D mediante SDS-PAGE, se observa el marcador de peso molecular (1), suero completo (2), fracción abundante posterior a la separación (3) y fracción poco abundante (4). B. Perfiles 2D de suero completo y fracciones, para el suero completo se utilizó 1 mg y tinción de Coomassie Blue y para las fracciones se emplearon 50 μ g de muestra y marcaje DIGE.

Por lo anterior se emplearon geles 2D-DIGE para las fracciones de proteínas obtenidas tras la cromatografía de afinidad. La Figura 2 presenta el patrón electroforético de las fracciones de proteínas de suero donde se observan las diferencias de acumulación entre los grupos con diabetes y el grupo control, la imagen fusionada de las muestras que corrieron en el mismo gel nos permitió ver de una manera más clara las diferencias en la intensidad de un spot en particular, pues este presenta un coloración verde cuando la proteína está enriquecida en el control, un color rojo si se encuentra enriquecida en el grupo con diabetes y en amarillos si la intensidad es igual en ambas condiciones.

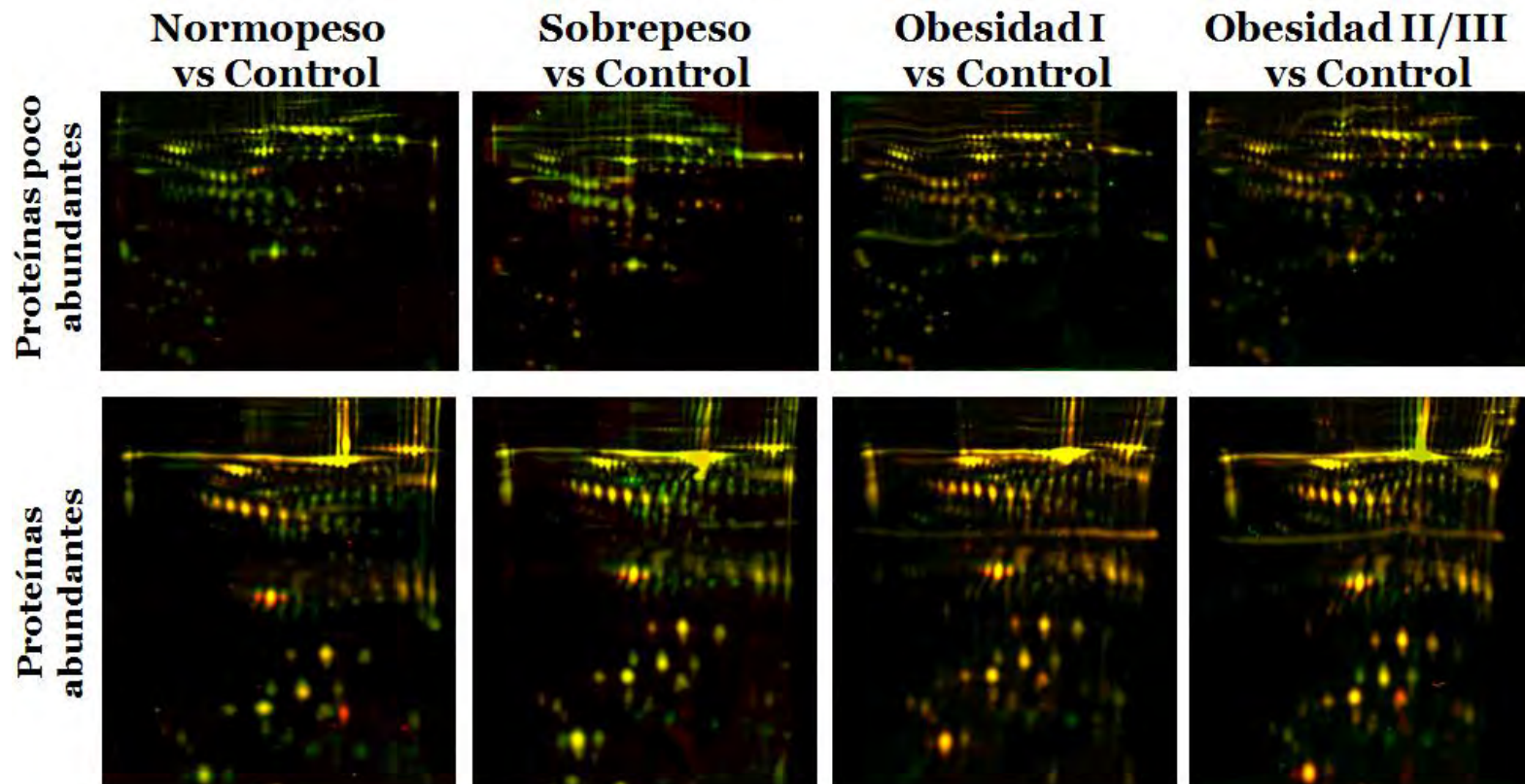


Figura 2. Imagen combinada del grupo control y los grupos de pacientes con diabetes tipo 2 de las proteínas poco abundantes y las proteínas abundantes. En verde se observan las proteínas características del grupo control, en rojo las proteínas únicas en el grupo de pacientes diabéticos y en amarillo las proteínas presentes en ambas condiciones.

3.3. Análisis de variación biológica de las proteínas de suero y análisis extendido de datos

Para determinar la acumulación diferencial de las proteínas entre los geles se requiere un análisis para detectar, cuantificar y alinear las imágenes obtenidas. Para hacer las comparaciones se empleó el programa DeCyder 2D que está específicamente diseñado para los casos donde se usa el marcaje fluorescente con CyDye. El programa estima la abundancia de una proteína en relación a la intensidad de píxeles en la imagen. Para poder comparar las imágenes provenientes de diferentes geles, se realizó una normalización con respecto al estándar interno incluido en cada gel, que corresponde a una mezcla a partes iguales de las muestras en el estudio. Posterior a la normalización se pueden comparar las abundancias relativas de una mancha entre los diferentes grupos (Alban et al. 2003).

La sección del programa para el análisis de variación biológica (BVA) es la que nos permitió alinear imágenes y realizar un análisis estadístico entre la abundancia de las proteínas en los diferentes grupos. La Figura 3 muestra los resultados en el modulo BVA para una mancha diferencial representativa del estudio, se observa una diferencia entre los grupos con una tendencia de incremento de la abundancia con respecto al índice de masa corporal. Para el grupo control y los grupos que presentaban diabetes se realizó una prueba de ANOVA de una vía para el log de la abundancia (obtenido a partir de la intensidad de los píxeles de una mancha). Se encontraron 57 proteínas diferenciales en la fracción de proteínas poco abundantes ($p < 0.05$) y 56 proteínas diferencialmente acumuladas en la fracción abundante ($p < 0.01$) las cuales fueron digeridas para su análisis mediante MS. El valor p fue establecido en base a la variación intergel de acuerdo a la recomendación del manual. En el caso de las proteínas poco abundantes no se pudieron identificar las proteínas presentes en 13 de las manchas cortadas y 8 de las abundantes, debido a que presentaban una intensidad muy baja o porque no fue posible su identificación pues no existían alineamientos significativos de los péptidos contra la base de datos utilizada al analizar resultados con MASCOT. En los anexos Tabla A1 y A2, se encuentran

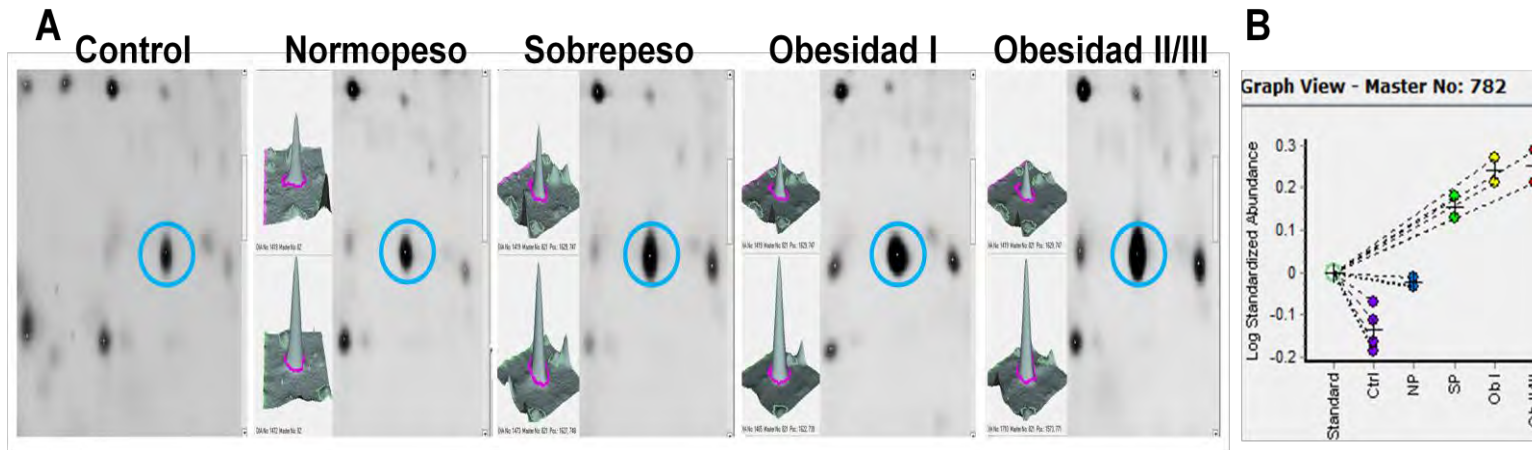


Figura 3. Mancha diferencial en proteínas poco abundantes observado en el análisis de variación biológica. A. Vista de la imagen y vista 3D mostrando la abundancia relativa de la mancha en el grupo problema (parte superior) comparado con el spot en el grupo control (parte inferior). B. Representación gráfica en el programa de la tendencia de la abundancia de la mancha.

resumidas las identificaciones mediante MS para cada mancha, así como los resultados del análisis de variación biológica para las fracciones FT14 y E14.

Sin considerar las manchas en las cuales no hubo ningún alineamiento significativo, se pudieron identificar proteínas en 92 manchas (44 poco abundantes y 48 abundantes). Al analizar mediante MASCOT la información de esas manchas se encontró que dentro de las identificaciones existían 64 proteínas diferentes. Con la finalidad de obtener más información sobre estas proteínas se realizó una búsqueda en Gene Ontology para conocer las diferentes categorías en las cuales se pueden clasificar de acuerdo a su función molecular y su proceso biológico. Se observó que las proteínas de acuerdo a su función molecular se distribuyen en las categorías: actividad antioxidante, proteína de unión, actividad catalítica, regulación enzimática, actividad de factor de transcripción de unión a ADN, actividad de receptor, función como molécula estructural y de transporte, y otras; siendo aquellas con actividad metabólica, regulación enzimática y unión las más representadas (Figura 4A). De acuerdo al proceso biológico en el que participan aquellas mayormente representadas son las categorías de proceso metabólico, regulación biológica, respuesta a estímulos y procesos del sistema inmune, con un 17%, 14%, 11% y 11% respectivamente (Figura 4B).

Algunos proyectos como el "Human Diabetes Proteome Project" (HDPP) que se desprende de la Organización HUPO (Human Proteome Organization) se han dedicado a generar conocimiento en cambios celulares asociados a diabetes mediante la unión de la información obtenida de fluidos humanos, órganos y células de individuos sanos y diabéticos, así como animales modelo de la enfermedad. Su principal objetivo es obtener información comprensible sobre mecanismo de la enfermedad e identificar proteínas e isoformas asociadas con la patogénesis de diabetes, importantes para desarrollar mejores estrategias de diagnósticos, terapias y prevención (Topf et al. 2013). Gracias a estas iniciativas en la actualidad existe una lista de 1379 proteínas, identificadas en diferentes modelos mediante técnicas proteómicas, que presentan asociación con diabetes. Se comparó la lista de las 64 proteínas diferentes identificadas en este estudio y se encontró que 27 no habían sido reportadas por el HDPP.

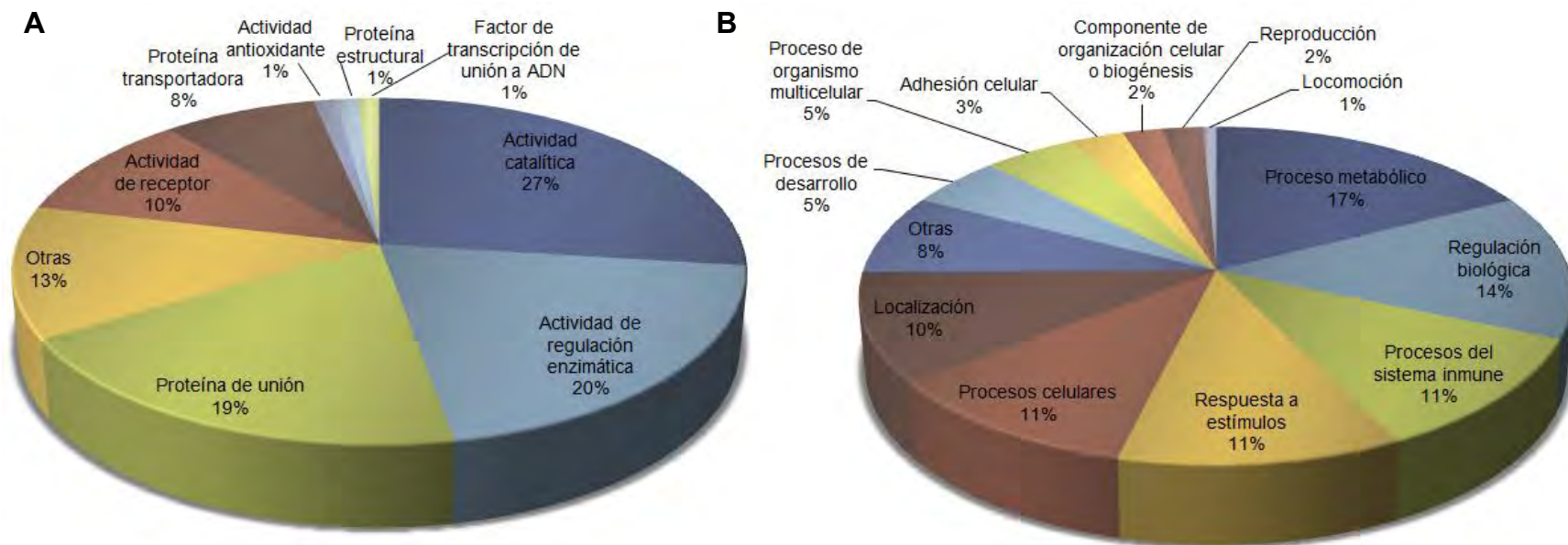


Figura 4. Clasificación de las proteínas diferenciales. La gráfica de pastel muestra la distribución de acuerdo a A) función molecular y B) proceso biológico en el que participan las proteínas identificadas de acuerdo a Gene Ontology.

De estas proteínas una gran cantidad corresponde a glicoproteínas. Un 22.2% de las proteínas fueron identificadas en la fracción E14 y el resto (88.8%) corresponde a proteínas de la fracción FT14.

3.4. Establecimiento del patrón de variación y agrupamiento.

La idea que considera "una proteína-una enfermedad" no debe ser una regla general para enfermedades complejas como cáncer, diabetes u obesidad (Parker et al. 2014). El descubrimiento de biomarcadores de suero ha sido exitoso, pero aun se debe considerar que en algunos casos las proteínas individuales son insuficientes para validar un diagnóstico clínico, por lo que el siguiente paso en esos casos será descubrir y utilizar diversos biomarcadores que tengan patrones de regulación similares, con lo cual se tendrá un diagnóstico más valido incluso antes de la aparición de los síntomas. (Pusch et al. 2003).

Para evaluar patrones similares de regulación y conocer la tendencia de las proteínas diferenciales y su comportamiento en los diferentes grados de obesidad se realizó un análisis extendido de datos (DEA). Este análisis de patrón consiste en la aplicación de algoritmos que pueden ayudar a encontrar subgrupos de datos (Clusters) en los patrones de abundancia de las proteínas diferenciales de cada condición de una manera más sencilla. Los resultados del análisis de variación biológica se procesaron para generar "Heat maps" de aquellas proteínas diferencialmente acumuladas entre el grupo control y los grupos problema, al mismo tiempo se realizó una agrupación jerárquica de las proteínas con comportamiento similar a través de los grupos, esto se presenta como un cladograma el cual muestra contiguas las proteínas con patrones similares (Figura 5).

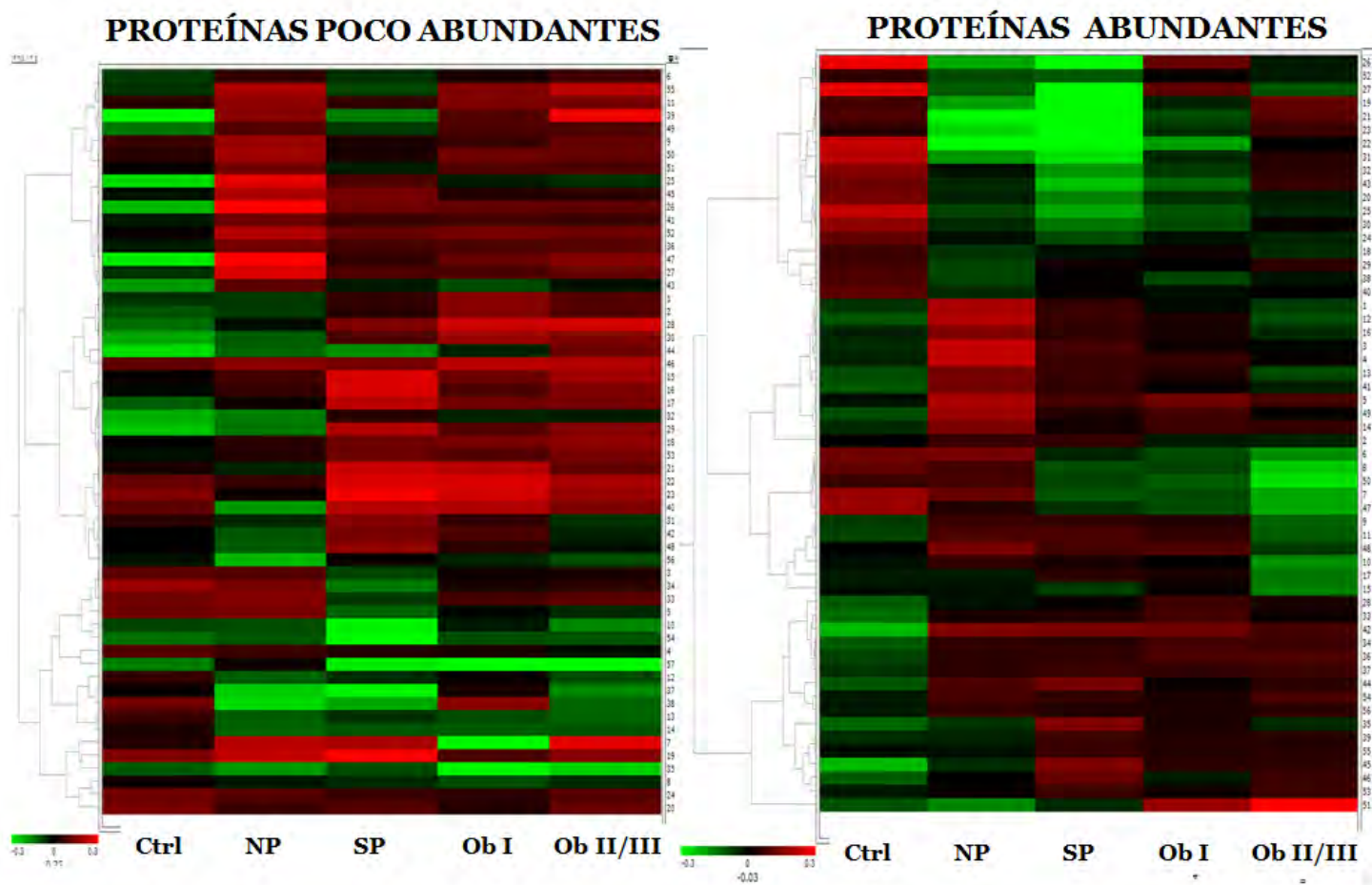


Figura 5. Representación gráfica mediante "Heat map" de las proteínas diferencialmente acumulada en la fracción de proteínas poco abundantes y abundantes. Las columnas representan los diferentes grupos y las líneas cada una de las manchas diferenciales. El incremento o disminución de la abundancia de una mancha está indicado en rojo y verde respectivamente en base a una escala relativa (-0.3 a 0.3)

En este punto se puede hacer una estimación aproximada del número de grupos de proteínas con la misma tendencia analizando el cladograma pero para obtener un agrupamiento más detallado es recomendable realizar un análisis de partición, por ejemplo los mapas de auto organización (SOM) en los cuales las proteínas que varían de una manera similar son clasificados en un número definido de clusters pero mantienen la topología de la información, grupos con perfiles similares se muestran contiguos. El Tabla A3, presenta los diferentes grupos encontrados, así como las proteínas identificadas por cluster, en el caso de las proteínas menos abundantes se obtuvieron 12 grupos y para las abundantes se obtuvieron 9 grupos. Estos clusters se definieron considerando que a ese número se encontraron los mejores valores de calidad del agrupamiento y grupos más homogéneos (en cuanto a cantidad de proteínas por grupo y en cuanto a similitud entre las proteínas agrupadas juntas).

Analizando la tendencia que presentaron las proteínas en cada cluster en los diferentes grupos de estudio se pudo definir si las proteínas estaban asociadas a cierta variante del estudio. Las posibles variantes son: proteínas relacionadas a diabetes y obesidad (donde todos los grupos con diabetes presentan un incremento o disminución significativo respecto al control y entre los grupos de diabetes se observa un incremento/disminución gradual proporcional al grado de obesidad) proteínas relacionadas a diabetes pero sin relación con el grado de obesidad (todos los grupos con diabetes presentan un incremento o disminución significativa respecto al control sin observar incremento/disminución gradual respecto al grado de obesidad), proteínas relacionadas a obesidad pero sin relación a diabetes (no existe diferencia significativa entre el control y el grupo con diabetes con normopeso pero si hay diferencia entre los grupos con sobrepeso y obesidad respecto al control), proteínas con variación puntual (aquellas en las que no se puede definir una tendencia en particular pues uno o más grupos con diabetes presenta un comportamiento diferente al resto). La Figura 6 presenta un resumen de las posibles tendencias observadas.

Se encontró que no todos los grupos presentan proteínas con un solo tipo de tendencia, esto era más común en aquellos grupos donde el número de proteínas

en el cluster era alto. Las proteínas relacionadas a diabetes que presentaron disminución en su abundancia se ubicaron en el grupo 1 y en los grupos 1, 2 y 3, mientras que aquellas que incrementan en condiciones diabéticas se ubicaron en los grupos 7, 8, 9, 10 y 11 y en los grupos 8 y 9 de las fracciones FT14 y E14 respectivamente. Las proteínas relacionadas a obesidad que presentaron un incremento en su abundancia se encontraron en los grupos 2, 3 y 4 (FT14) y existieron algunos casos en el grupo 9 (E14); aquellas que disminuyeron su abundancia se encontraron en el grupo 10 (FT14) y algunos casos en el grupo 4 y 6 (E14). En el caso de aquellas proteínas relacionadas tanto a diabetes como a obesidad y que incrementaron su abundancia se localizaron en los grupos 4 y 5 (FT14) y algunos casos en el grupo 9 (E14); algunos casos que disminuyeron se ubicaron en el grupo 12 (FT14) y el grupo 4 (E14).

Tras analizar en que grupos se encontraban aquellas proteínas que no estaban registradas en la lista del HDPP, se observó que todas se encuentran en clusters relacionados a diabetes y diabetes con obesidad. Confirmando que podrían servir como candidatos de marcadores para la enfermedad de pacientes mexicanos.

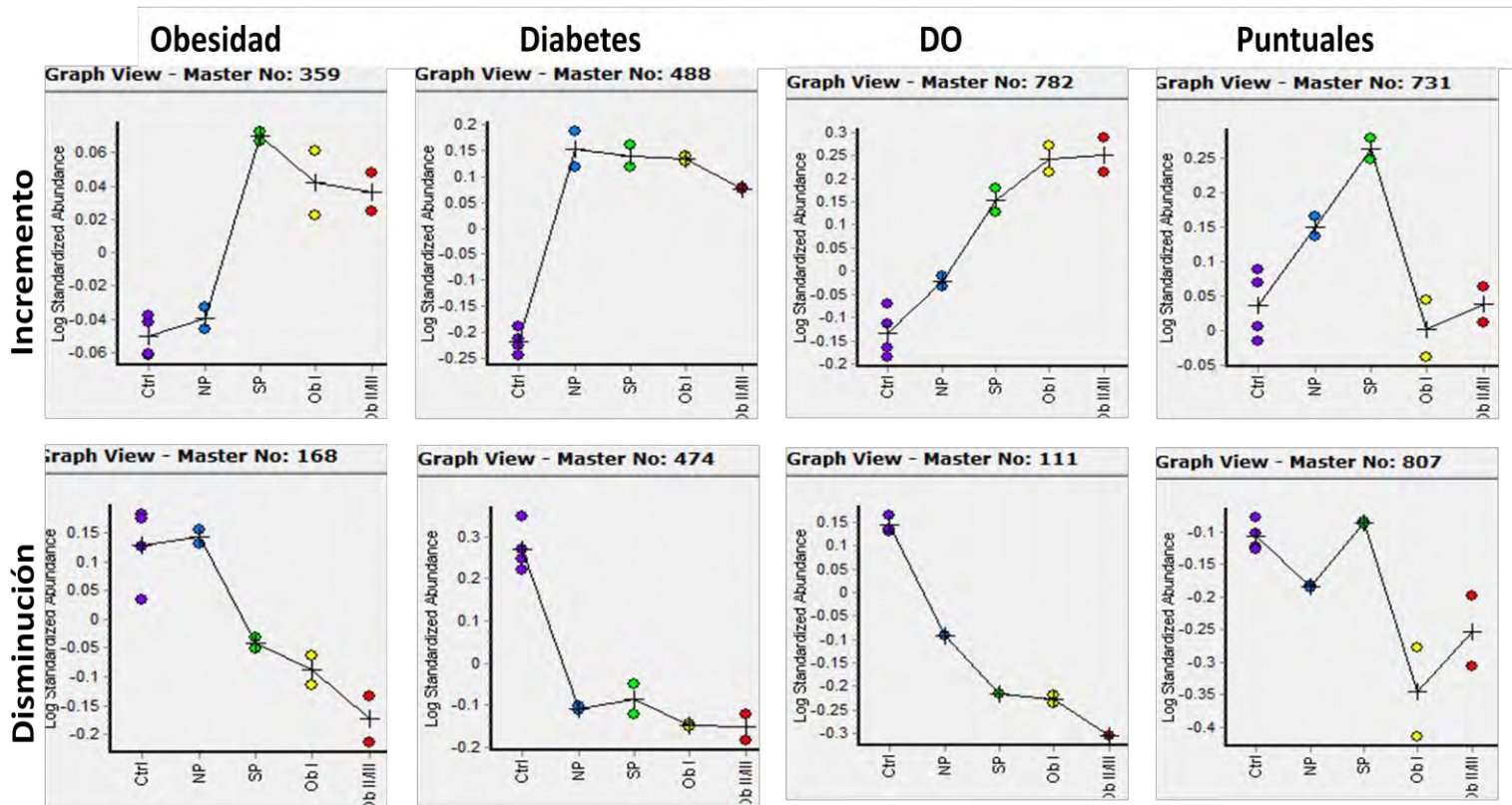


Figura 6. Tendencias observadas para diferentes manchas y su asociación con variantes del estudio. Estas tendencias fueron evaluadas dentro de los clusters generados para la clasificación de las manchas incluidas. Las gráficas fueron obtenidas en la sección de análisis de expresión diferencial dentro del análisis extendido de datos. Donde Ctrl: Control, NP: Normopeso, SP: Sobrepeso, ObI: Obesidad I y ObII/III: Obesidad II/III.

Conclusiones

El sistema MAGPIX es una tecnología de gran utilidad en el área clínica pues permite la detección simultánea de un gran número de moléculas. Representa una técnica complementaria a la proteómica en particular a los estudios basados en electroforesis 2-DE pues cuantifica moléculas de bajo peso molecular que son difíciles de apreciar mediante SDS-PAGE convencional.

En cuanto al fraccionamiento de la muestra, la remoción de las proteínas más abundantes de suero mejora la calidad de los geles 2-DE incrementando la capacidad de carga de las proteínas menos abundantes y favoreciendo su visualización pues no existe enmascaramiento por co-migración en el gel.

La técnica DIGE mejoró la reproducibilidad en el análisis ya que se eliminaron las variaciones por corrida pues la muestra control y la muestra problema pueden correr en el mismo gel y pueden ser detectadas diferencialmente. Incluir una mezcla a partes iguales de las muestras en el estudio como estándar interno facilita la comparación de proteínas entre diferentes geles pues agiliza el proceso de alineamiento y adicionalmente incrementa la confianza en las mediciones realizadas de la abundancia de una mancha ya estas se obtienen por comparación con la misma referencia. La disminución en la cantidad requerida de muestra por gel es una gran ventaja considerando que el tipo de muestra en estudio, proteínas poco abundantes (alrededor del 4% de las proteínas de suero), limita las técnicas de electroforesis 2-DE convencionales.

El analizar la fracción E14 de suero permitió identificar proteínas poco abundantes que son removidas de manera no específica al realizar la purificación por afinidad, es posible que estas proteínas sean acarreadas pues tienen interacción con aquellas de gran abundancia.

Subdividir los grupos con diabetes de acuerdo a su índice de masa corporal y evaluar la tendencia de las manchas en cada grupo permitió conocer si una proteína identificada está relacionada únicamente a diabetes, solamente a obesidad o a ambas situaciones.

La estrategia aquí reportada como fase de descubrimiento de biomarcadores favorece la identificación de nuevos candidatos que no habían sido reportados

previamente dentro de las listas de proteínas asociadas a la enfermedad, es posible que las proteínas reportadas puedan estar relacionados a las diferencias de susceptibilidad a diabetes entre población Mexicana y Europea.

4. Referencias

1. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3:36-44.
2. Albrecht A, Rahmoune H, Leedjarv K, Knorpp T, Joos T, Stocki P, et al. Development of a novel assay for proprotein converting enzyme activity on a multiplex bead-based array system. *Proteomics*. 2013;13:2976-9.
3. Ascencio-Montiel Ide J, Parra EJ, Valladares-Salgado A, Gomez-Zamudio JH, Kumate-Rodriguez J, Escobedo-de-la-Pena J, et al. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican type 2 diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2013;14:110.
4. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell*. 2012;148:1160-71.
5. Barquera S, Campos-Nonato I, Aguilar-Salinas C, Lopez-Ridaura R, Arredondo A, Rivera-Dommarco J. Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Global Health*. 2013;9:3.
6. 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.
7. Brown JE, Onyango DJ, Ramanjaneya M, Conner AC, Patel ST, Dunmore SJ, et al. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol*. 2010;44:171-8.
8. Byrne JC, Downes MR, O'Donoghue N, O'Keane C, O'Neill A, Fan Y, et al. 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res*. 2009;8:942-57.
9. Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J Proteome Res*. 2004;3:1120-7.
10. Di Girolamo F, Del Chierico F, Caenaro G, Lante I, Muraca M, Putignani L. Human serum proteome analysis: new source of markers in metabolic disorders. *Biomarkers in medicine*. 2012;6:759-73.
11. Diz AP, Truebano M, Skibinski DO. The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis*. 2009;30:2967-75.
12. Drucker DJ. Incretin-based therapy and the quest for sustained improvements in beta-cell health. *Diabetes Care*. 2011;34:2133-5.
13. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Feher J, Ghyczy D, Wichmann B, et al. Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One*. 2010;5:e12226.
14. Gharibeh MY, Al Tawallbeh GM, Abboud MM, Radaideh A, Alhader AA, Khabour OF. Correlation of plasma resistin with obesity and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2010;36:443-9.

15. Goetze S, Bungenstock A, Czupalla C, Eilers F, Stawowy P, Kintscher U, et al. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. *Hypertension*. 2002;40:748-54.
16. Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD, et al. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology*. 2006;147:3173-80.
17. Ikeda Y, Tsuchiya H, Hama S, Kajimoto K, Kogure K. Resistin regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448:129-33.
18. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev*. 2007;107:3601-20.
19. Juhan-Vague I, Alessi M, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia*. 1991;34:457-62.
20. Landreh M, Johansson J, Jornvall H. C-peptide: a molecule balancing insulin states in secretion and diabetes-associated depository conditions. *Horm Metab Res*. 2013;45:769-73.
21. López E, Madero L, López-Pascual J, Latterich M. Clinical proteomics and OMICS clues useful in translational medicine research. *Proteome Science*. 2012;11:2139-61.
22. Lopez-Villar E, Martos-Moreno GA, Chowen JA, Okada S, Kopchick JJ, Argente J. A proteomic approach to obesity and type 2 diabetes. *J Cell Mol Med*. 2015.
23. Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2008;83:804-16.
24. Ma X, Lee P, Chisholm DJ, James DE. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:1.
25. Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2005;48:1168-72.
26. Parker C, Borchers C. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation--quality assurance and control of protein biomarker assays. *Molecular Oncology*. 2010;8:840-58.
27. Perez-Fuentes R, Baez-Duarte BG, Zamora-Ginez I, Ruiz-Vivanco G, Pulido-Perez P, Nieva-Vazquez A, et al. Early decrease of insulin sensitivity in offspring of individuals with type 2 diabetes. The Mexican Diabetes Prevention Study. *Arch Med Res*. 2014;45:217-22.
28. Pusch W, Flocco MT, Leung SM, Thiele H, Kostrzewa M. Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics*. 2003;4:463-76.
29. Ray S, Reddy PJ, Jain R, Gollapalli K, Moiyadi A, Srivastava S. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: advances and challenges ahead. *Proteomics*. 2011;11:2139-61.
30. Rifai N, Gillette M, Carr S. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature biotechnology*. 2006;24:971-83.

31. Rocken C, Ebert MP, Roessner A. Proteomics in pathology, research and practice. *Pathol Res Pract*. 2004;200:69-82.
32. Sadiq S, Agranoff D. Pooling serum samples may lead to loss of potential biomarkers in SELDI-ToF MS proteomic profiling. *Proteome Science*. 2008;1:6-16.
33. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409:307-12.
34. Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res*. 2011;10:5-16.
35. Topf F, Schvartz D, Gaudet P, Priego-Capote F, Zufferey A, Turck N, et al. The Human Diabetes Proteome Project (HDPP): From network biology to targets for therapies and prevention. *Translational Proteomics*. 2013;1:3-11.
36. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:19-39.
37. Zhang AH, Sun H, Yan GL, Han Y, Wang XJ. Serum proteomics in biomedical research: a systematic review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;170:774-86.

5. Anexos

Tabla A1. Proteínas diferenciales identificadas en la fracción de proteínas poco abundantes de suero

Tabla A2. Proteínas diferenciales identificadas en la fracción de proteínas abundantes de suero

Tabla A3. Agrupamiento de manchas de acuerdo a su tendencia y proteínas identificadas por cluster

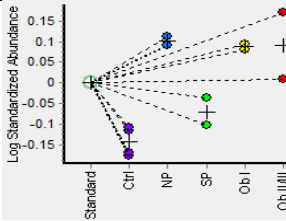
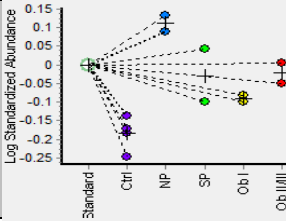
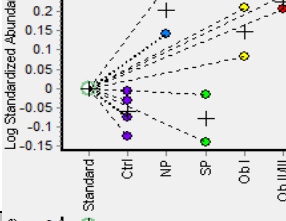
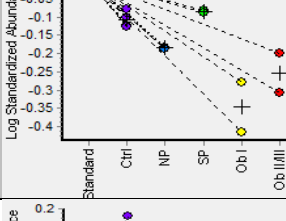
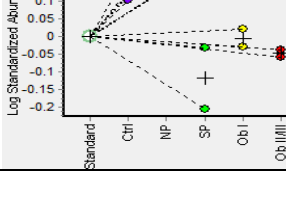
Tabla A1. Proteínas diferenciales identificadas en la fracción de proteínas poco abundantes de suero

Spot	Proteína	N° de acceso	Cobertura	Score	p/Masa Teóricos	p/Masa Experim.	ANOVA	Ctrl vs NP	Ctrl vs SP	Ctrl vs Ob I	Ctrl vs Ob II/III	Gráfica
1	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/96741	5.51/32666	5.3E-07	0.0000053	0.00175	0.000014	0.000001	
2	Complement factor H	CFAH_HUMAN	3%	134	6.21/143680	6.22/45597	0.000013	0.000045	0.00216	0.000795	0.000401	
3	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	43%	520	5.28/45371	5.28/45371	0.000028	0.0000453	0.00216	0.000795	0.000401	
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	56	6.55/52385							
	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	2%	51	5.56/54790							
4	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/96741	4.55/46923	3.47E-05	4.83E-03	4.08E-04	2.24E-01	8.24E-01	

5	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	17%	99	5.33/47792	4.30/64706	5.78E-05	0.239	0.000526	0.000974	0.0442	
6	Complement factor H	CFAH_HUMAN	1%	102	6.21/143680	6.03/45413	7.03E-05	0.171	0.00177	0.000331	0.000284	
7	-	-	-	-	-	5.84/38306	7.89E-05	6.23E-01	8.86E-05	8.82E-03	1.98E-02	
8	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	21%	123	5.28/45371		0.000101	0.000126	0.00159	0.0177	0.0351	
	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	2%	66	6.89/194170							
	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	4%	53	5.56/54790	5.42/55448						
9	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	4%	40	5.33/47792	5.89/81744	0.000369	0.00219	0.283	0.0265	0.0492	
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	4%	23	6.34/72996							
	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/96741							

10	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	33%	322	5.28/45371	5.35/55185	0.000472	0.000684	0.0105	0.0123	0.0127	
	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	7%	72	5.56/54790							
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	29	6.55/52385							
	Rhox homeobox family member 1	RHXF1_HUMAN	4%	24	5.77/20700							
11	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	1%	20	6.51/103521	5.87/45303	0.000505	0.57	0.00827	0.00181	0.00303	
	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/96741							
12	-	-	-	-	-	5.23/35054	5.59E-04	1.17E-03	1.44E-02	8.50E-03	4.79E-03	
13	Hemopexin	HEMO_HUMAN	4%	77	6.55/52385	6.01/88000	0.000799	0.0663	0.0125	0.00115	0.0125	
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	46	5.44/122983							
	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	8%	44	5.33/47792							

14	Complement factor I	CFAI_HUMAN	5%	117	7.72/ 68102	4.72/ 44615	0.000879	0.0562	0.0325	0.994	0.0448	
	Clusterin	CLUS_HUMAN	12%	75	5.89/ 53031							
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	5%	71	6.34/ 72996							
15	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	28	6.55/ 52385	4.57/ 17831	0.00173	0.0899	0.22	0.129	0.0388	
	Dermcidin	DCD_HUMAN	10%	24	6.08/ 11391							
	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/ 96741							
16	Hemopexin	HEMO_HUMAN	4%	86	6.55/ 52385	5.76/ 94923	0.00204	0.996	0.00268	0.102	0.151	
17	Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	11%	103	5.28/ 12782	6.13/ 81710	0.00212	0.00593	0.854	0.0954	0.151	
	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	18%	77	5.58/ 11773							
	Ig kappa chain V-III region HAH	KV312_HUMAN	36%	68	7.74/ 14178							
	Ig kappa chain V-III region SIE	KV302_HUMAN	43%	68	8.70/ 11882							
	Ig kappa chain V-III region B6	KV301_HUMAN	16%	55	9.34/ 11742							
	Ig kappa chain V-I region AG	KV101_HUMAN	16%	26	5.67/ 12099							
	Ig lambda-2 chain C regions	LAC2_HUMAN	23%	26	6.92/ 11458							

18	Vitronectin	VTNC HUMAN	2%	32	5.55/ 55069	4.49/ 10177	0.00246	0.0106	0.617	0.0146	0.0136	
19	-	-	-	-	-	5.90/ 38242	0.00325	0.00347	0.0868	0.398	0.0717	
20	Vitronectin	VTNC HUMAN	2%	34	5.55/ 55069	4.63/ 9395	0.00377	0.0274	0.998	0.0814	0.0189	
21	-	-	-	-	-	5.90/ 38242	0.00395	0.508	0.989	0.00816	0.0882	
22	Hemopexin	HEMO HUMAN	4%	91	6.55/ 52385	5.75/ 95909	0.0042	1	0.0101	0.149	0.0519	
	Complement C4-B	CO4B HUMAN	1%	46	6.89/ 194170							

23	-	-	-	-	-	6.08/ 76760	0.00428	0.331	0.0077	0.0389	0.0335	
24	-	-	-	-	-	4.87/ 14464	0.00448	0.021	0.574	0.605	0.981	
25	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL HUMAN	2%	49	6.45/ 38382	4.38/ 63333	0.00592	0.121	0.1	0.295	0.96	
	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT HUMAN	8%	35	5.33/ 47792							
	Hemopexin	HEMO HUMAN	2%	24	6.55/ 52385							
26	Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G HUMAN	7%	62	5.71/ 34465	5.24/ 32174	0.00638	0.0246	0.0506	0.997	0.148	
27	-	-	-	-	-	4.09/ 96500	0.0071	0.818	0.866	0.0305	0.663	

28	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	41	6.55/ 52385	5.22/ 54370	0.0075	0.00749	0.223	0.221	0.118	
	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	7%	26	5.28/ 45371							
	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	2%	57	6.89/ 194170							
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	50	6.55/ 52385							
29	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	13%	152	5.33/ 47792	5.16/ 82168	0.00831	0.998	0.0185	0.841	0.472	
	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	7%	120	5.56/ 54790							
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	6%	85	6.55/ 52385							
	Vitronectin	VTNC_HUMAN	5%	72	5.55/ 55069							
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	3%	71	5.44/ 122983							
	Antithrombin-III	ANT3_HUMAN	7%	64	6.32/ 53025							
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	5%	55	6.34/ 72996							
30	Hemopexin	HEMO_HUMAN	9%	81	6.55/ 52385	6.12/ 95672	0.0087	0.0466	1	0.135	0.0305	
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	24	5.44/ 122983							
31	Clusterin	CLUS_HUMAN	7%	91	5.89/ 53031	4.82/ 45615	0.0107	0.014	0.0788	0.731	0.594	
	Complement factor I	CFAI_HUMAN	5%	75	7.72/ 68102							
	Histidine-rich glycoprotein	HRG_HUMAN	5%	21	7.09/ 60510							

32	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITI4 HUMAN	9%	327	6.51/ 103521	4.57/ 70348	0.0124	0.557	0.0443	0.103	0.0288	
	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA HUMAN	5%	108	5.43/ 40098							
	Kininogen-1	KNG1 HUMAN	7%	99	6.34/ 72996							
33	-	-	-	-	-	4.84/ 22719	0.0131	0.0222	0.969	0.979	0.522	
34	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT HUMAN	7%	55	5.33/ 47792	4.34/ 63235	0.015	0.723	0.112	0.114	0.527	
	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL HUMAN	2%	34	6.45/ 38382							
35	Clusterin	CLUS HUMAN	10%	91	5.89/ 53031	4.91/ 44308	0.0162	0.0202	0.223	0.136	0.17	
	Complement factor I	CFAI HUMAN	3%	76	7.72/ 68102							

36	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	44	6.55/ 52385	5.09/ 35761	0.0162	0.0226	0.18	0.127	0.142	
	Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	4%	27	5.71/ 34465							
	Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN	11%	27	8.26/ 25765							
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITI4_HUMAN	1%	24	6.51/ 103521							
	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	1%	22	6.65/ 194261							
	MAGUK p55 subfamily member 2	MPP2_HUMAN	1%	20	6.32/ 64882							
37	Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN	21%	70	8.26/ 25765	5.09/ 33967	0.0157	0.0312	-	0.981	0.117	
	Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	7%	66	5.71/ 34465							
38	-	-	-	-	-	4.19/ 18744	0.0201	0.853	0.0219	0.553	0.194	
39	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/ 96741	6.22/ 75714	0.0196	5.38E-01	8.39E-01	1.97E-01	2.10E-02	

40	Angiotensinogen	ANGT_HUMAN	2%	69	5.87/ 53406	6.36/ 80795	0.0206	0.0537	1	0.146	0.17	
	Beta-2-glycoprotein 1	APOH_HUMAN	2%	53	8.34/ 39584							
41	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	1%	90	6.65/ 194261	4.69/ 58148	0.0218	0.721	0.0828	0.035	0.703	
	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL_HUMAN	2%	61	6.45/ 38382							
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	59	6.55/ 52385							
42	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	5%	42	5.56/ 54790	5.11/ 78243	0.0221	0.0432	0.229	0.773	0.0752	
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	9%	30	6.34/ 72996							
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	4%	29	6.51/ 103521							
43	-	-	-	-	-	5.21/ 81786	0.0238	0.99	0.0506	0.997	0.997	

44	Hemopexin	HEMO_HUMAN	4%	47	6.55/ 52385	5.18/ 78108	0.024	0.0756	0.239	0.124	0.0594	
	Vitamin D-binding protein	VTDB_HUMAN	3%	43	5.40/ 54526							
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	26	5.44/ 122983							
45	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	1%	85	6.89/ 194170	5.88/ 97385	0.0265	0.818	0.422	0.246	0.0279	
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	4%	82	6.55/ 52385							
46	Hemopexin	HEMO_HUMAN	4%	97	6.55/ 52385	4.52/ 42154	0.0273	0.0766	0.769	1	0.601	
47	Hemopexin	HEMO_HUMAN	8%	119	6.55/ 52385	5.68/ 82262	0.0266	0.878	0.039	0.207	0.179	
	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	6%	95	5.33/ 47792							
	Vitronectin	VTNC_HUMAN	2%	58	5.55/ 55069							
	Beta-2-glycoprotein 1	APOH_HUMAN	17%	51	8.34/ 39584							
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	2%	29	6.34/ 72996							
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	2%	21	5.44/ 122983							

48	Hemopexin	HEMO_HUMAN	2%	43	6.55/ 52385	5.60/ 104638	0.0276	0.993	0.329	0.0513	0.143	
	Complement factor B	CFAB_HUMAN	1%	33	6.67/ 86847							
	Plasma protease C1 inhibitor	IC1_HUMAN	2%	27	6.09/ 55347							
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	24	5.44/ 122983							
	Lymphoid-restricted membrane protein	LRMP_HUMAN	1%	19	5.62/ 62767							
49	-	-	-	-	-	5.93/ 71429	0.0303	0.478	0.1	0.728	0.998	
50	-	-	-	-	-	5.95/ 77429	0.0338	0.809	0.0431	0.473	0.165	
51	Vitamin D-binding protein	VTDB_HUMAN	4%	43	5.40/ 54526	5.89/ 70142	0.0359	0.559	0.889	0.0661	0.103	
	Complement factor I	CFAI_HUMAN	6%	25	7.72/ 68102							
	Beta-2-glycoprotein	APOH_HUMAN	4%	21	8.34/ 39584							

52	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN	5%	96	5.43/ 40098	4.62/ 76184	0.036	0.848	0.169	0.149	0.0724	
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	7%	86	6.34/ 72996							
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	5%	76	6.51/ 103521							
53	Protein AMBP	AMBP_HUMAN	2%	49	5.95/ 39886	5.60/ 39290	0.0367	0.986	0.0535	0.881	0.991	
	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	1%	27	6.65/ 194261							
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	1%	26	6.51/ 103521							
	Pigment epithelium-derived factor	EDF_HUMAN	2%	26	5.97/ 46454							
54	-	-	-	-	4.65/ 19705	0.0394	0.517	0.246	0.638	0.956		
55	Complement factor B	CFAB_HUMAN	3%	94	6.67/ 86847	5.66/ 103274	0.0409	1	0.463	0.0795	0.265	
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	32	5.44/ 122983							
	Coiled-coil domain-containing protein 87	CCD87_HUMAN	1%	20	8.74/ 96741							

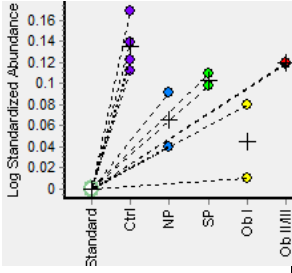
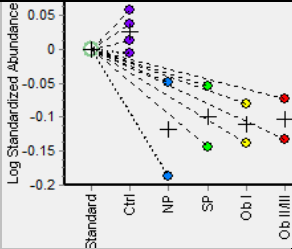
56	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	7%	109	6.51/ 103521	4.71/ 68382	0.0451	0.18	0.76	0.0685	0.972	
	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN	5%	68	5.43/ 40098							
	Alpha-2-antiplasmin	A2AP_HUMAN	2%	50	5.87/ 54873							
	Vitamin D-binding protein	VTDB_HUMAN	5%	40	5.40/ 54526							
57	Antithrombin-III	ANT3_HUMAN	19%	220	6.32/ 53025	5.27/ 77164	0.047	0.124	0.2	0.151	0.18	
	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	11%	112	6.34/ 72996							
	Vitronectin	VTNC_HUMAN	5%	95	5.55/ 55069							
	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	4%	78	5.33/ 47792							
	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	1%	60	5.44/ 122983							
	Hemopexin	HEMO_HUMAN	6%	59	6.55/ 52385							
	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG_HUMAN	4%	44	5.66/ 54790							

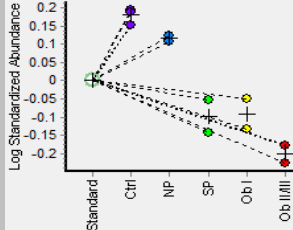
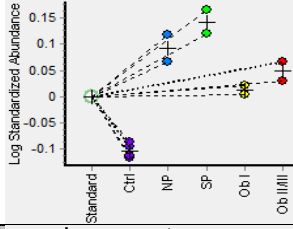
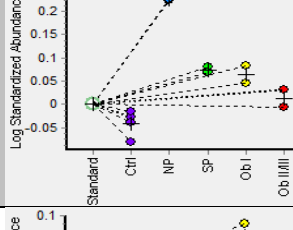
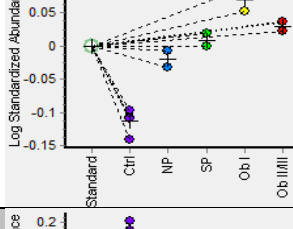
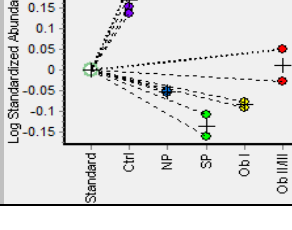
Tabla A2. Proteínas diferenciales identificadas en la fracción de proteínas abundantes de suero

Spot	Proteína	N° de acceso	Cobertura	Score	pI/Masa Teóricos	pI/Masa Experm	ANOVA	Ctrl vs NP	Ctrl vs SP	Ctrl vs Ob I	Ctrl vs Ob II/(III)	Gráfica
1	Serum albumin	ALBU_HUMAN	13%	110	5.92/ 71317	5.41/ 47673	1.74E-08	0.00000118	5.3E-08	0.00275	1	
2	Dermcidin	DCD_HUMAN	10%	53	6.08/ 11391	4.62/ 43960	3.29E-07	0.00781	3.11E-07	0.0000231	0.00301	
	Haptoglobin	HPT_HUMAN	15%	41	6.13/ 45861							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	5%	22	5.92/ 71317							
3	-	-	-	-	-	5.61/ 40347	5.47E-07	0.00000393	8.92E-07	0.0000569	0.000808	
4	Haptoglobin	HPT_HUMAN	9%	112	6.13/ 45861	4.87/ 44703	8.75E-07	0.00000393	8.92E-07	0.00000569	0.000808	

5	Serum albumin	ALBU_HUMAN	10%	65	5.92/ 71317	5.27/ 48168	9.97E-06	0.000411	0.0000017 1	0.0000169	0.0000166	
	Dermcidin	DCD_HUMAN	10%	30	6.08/ 11391							
6	Haptoglobin	HPT_HUMAN	6%	70	6.13/ 45861		1.01E-06	0.0000665	9.02E-07	0.00105	0.031	
7	-	-	-	-	-		1.56E-06	0.245	0.267	0.0000719	0.000006	
8	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	34%	224	5.56/ 30759	5.37/ 25000	1.8E-06	0.0000104	0.0000131	0.0000149	0.0000482	
	C-X-C motif chemokine	CXCL2_HUMAN	10%	31	10.57/ 11609							
	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	OIT3_HUMAN	1%	23	5.34/ 62206							

9	Haptoglobin	HPT_HUMAN	12%	137	6.13/ 45861	4.99/ 43800	2.32E-06	0.0000315	0.0000364	0.0000115	0.0000174	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	1%	27	5.92/ 71317							
10	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	17%	101	6.08/ 38486	5.56/ 62222	3.1E-06	0.0000361	0.0000503	0.000154	0.368	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	6%	86	5.92/ 71317							
	Dermcidin	DCD_HUMAN	10%	44	6.08/ 11391							
11	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	15%	211	6.08/ 38486	5.56/ 62222	3.21E-06	0.0000052	0.000275	0.00114	0.972	
	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2_HUMAN	12%	110	5.92/ 71317							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	5%	28	6.08/ 11391							
12	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	13%	308	6.81/ 79294	5.85/ 49713	3.63E-06	0.0000144	0.00111	0.0000114	0.000255	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	1%	67	5.92/ 71317							

13	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	45%	373	5.56/ 30759	5.25/ 25858	5.37E-06	0.0000079 7	0.0000973	0.000924	0.03	
14	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	17%	226	6.08/ 38486	5.71/ 60909	5.87E-06	0.000112	0.00019	0.000758	0.0271	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	9%	65	5.92/ 71317							
	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2*	ASAP2_HUMAN	1%	26	6.24/ 112835							
15	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	19%	127	6.08/ 38486	5.41/ 63272	1.39E-05	0.0000416	0.000342	0.00127	1	
	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2_HUMAN	14%	123	5.71/ 37301							
16	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	11%	284	6.81/ 79294	6.53/ 94250	0.000018	0.0000196	0.00292	0.0811	0.335	
	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	6%	47	6.35/ 49960							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	1%	24	5.92/ 71317							
17	Serum albumin	ALBU_HUMAN	17%	426	5.92/ 71317	5.76/ 45800	2.82E-05	0.000488	0.0000618	0.000325	0.00119	

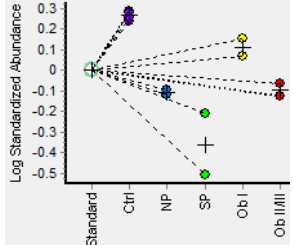
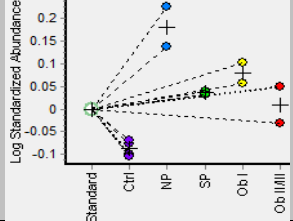
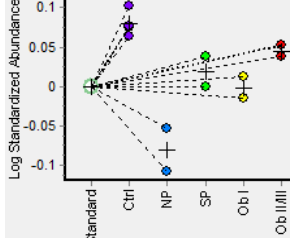
18	Serum albumin	ALBU_HUMAN	19%	434	5.92/ 71317	5.81/ 71842	3.66E-05	0.436	0.000715	0.0008	0.0000924	
19	Haptoglobin	HPT_HUMAN	6%	122	6.13/ 45861	5.87/ 17902	4.02E-05	0.000335	0.0000741	0.00765	0.00164	
20	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	10%	364	6.81/ 79294	6.60/ 91842	0	0	0	0	0	
21	Haptoglobin	HPT_HUMAN	7%	98	6.13/ 45861	4.75/ 46931	5.22E-05	0.00619	0.00132	0.0000989	0.000496	
22	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	4%	98	4.76/ 28179	5.52/ 43700	5.47E-05	0.000967	0.000128	0.000416	0.00722	
	Haptoglobin	HPT_HUMAN	12%	74	6.13/ 45861							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	1%	22	5.92/ 71317							

23	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	11%	95	6.08/ 38486	5.79/ 61481	6.33E-05	0.00723	-	0.719	0.000301	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	7%	35	5.92/ 71317							
24	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	13%	270	6.81/ 79294	6.67/ 88333	6.49E-05	0.0000867	0.0143	0.000824	0.0144	
	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	4%	28	4.76/ 28179							
25	Haptoglobin	HPT_HUMAN	9%	133	6.13/ 45861	5.13/ 42850	6.61E-05	0.00194	0.000829	0.000338	0.000273	
26	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	3%	38	6.81/ 79294	6.31/ 61481	0.000127	0.983	0.0651	0.353	0.000344	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	6%	36	5.92/ 71317							
	Dermcidin	DCD_HUMAN	10%	26	6.08/ 11391							
27	Haptoglobin	HPT_HUMAN	11%	129	6.13/ 45861	5.47/ 38092	0.000132	0.000739	0.000293	0.13	0.0133	

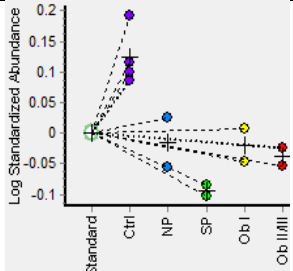
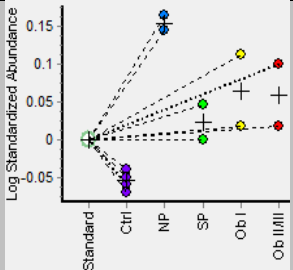
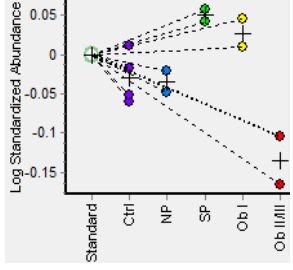
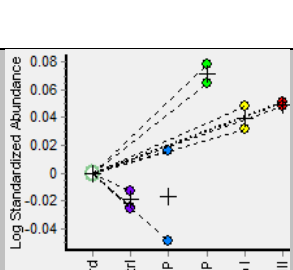
28	Haptoglobin	HPT_HUMAN	18%	135	6.13/ 45861	5.67/ 38063	0.000137	0.933	0.000431	0.00221	0.00322	
29	Serum albumin	ALBU_HUMAN	4%	106	5.92/ 71317	5.37/ 15061	0.00014	0.0608	0.00349	0.00212	0.00022	
	Transthyretin	TTHY_HUMAN	18%	50	5.52/ 15991							
30	-	-	-	-	-	6.62/ 48706	0.000163	0.00144	0.000299	0.262	0.018	
31	Serum albumin	ALBU_HUMAN	17%	302	5.92/ 71317	5.34/ 47600	0.00017	0.0374	0.000255	0.692	1	
32	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	65%	241	5.58/ 11773	6.54/ 27426	0.000207	0.000773	0.00233	0.0363	0.000934	
	Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	11%	82	5.28/ 12782							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	4%	71	5.92/ 71317							

	Ig lambda chain V-I region HA	LV102_HUMAN	11%	69	9.07/12003							
	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	KV309_HUMAN	7%	36	4.85/12681							
	Ig lambda-2 chain C regions	LAC2_HUMAN	32%	34	6.92/11458							
	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	KV401_HUMAN	7%	33	5.09/13486							
33	Transthyretin	TTHY_HUMAN	33%	180	5.52/15991	5.66/14844	0.000293	0.00328	0.0534	0.0333	0.0853	
34	Serum albumin	ALBU_HUMAN	18%	247	5.92/71317	5.74/43250	0.00037	0.0238	0.000486	0.00563	0.188	
	Haptoglobin-related protein	HPTR_HUMAN	3%	24	6.63/39518							
35	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	11%	254	6.81/79294	6.47/92895	0.00042	0.000678	0.0488	0.566	0.994	
	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	18%	130	6.35/49960							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	1%	24	5.92/71317							

36	Haptoglobin	HPT_HUMAN	6%	50	6.13/ 45861	5.87/ 17146	0.000457	0.0403	0.00073	0.148	0.00353	
37	Serum albumin	ALBU_HUMAN	10%	212	5.92/ 71317	5.90/ 71842	0	1	0	0	0	
	Otopetrin-3	OTOP3_HUMAN	1%	29	8.96/ 67222							
38	-	-	-	-	-	5.30/ 41980	0	0	0	0	0	
39	Serum albumin	ALBU_HUMAN	7%	99	5.92/ 71317	6.37/ 24609	0.0005	0.0351	0.000791	0.00687	0.572	
	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	29%	54	5.58/ 11773							
40	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	32%	65	5.58/ 11773	6.03/ 26775	0.000561	-	0.000663	0.0099	-	
	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	KV401_HUMAN	7%	49	5.09/ 13486							
	Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	11%	37	5.28/ 12782							

	Ig kappa chain V-III region SIE	KV302_HUMAN	8%	29	8.70/ 11882							
	Ig lambda-1 chain C regions	LAC1_HUMAN	14%	26	7.89/ 11512							
	Ig kappa chain V-I region Lay	KV113_HUMAN	8%	21	7.96/ 11941							
	Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	KV303_HUMAN	9%	21	6.29/ 10836							
41	-	-	-	-	-	6.46/ 45900	0.000567	0.0152	0.000749	0.393	0.0178	
42	-	-	-	-	-	4.75/ -	0.000595	0.000668	0.0481	0.0111	0.13	
43	Serum albumin	ALBU_HUMAN	23%	575	5.92/ 71317	5.44/ 44100	0.000869	0.000882	0.126	0.0388	0.535	
	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	TNR6C_HUMAN	1%	23	6.47/ 176427							

44	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	6%	57	5.37/ 46878	5.25/ 59500	0.000893	0.00147	0.105	0.27	0.976	
45	Serum albumin	ALBU_HUMAN	19%	350	5.92/ 71317	5.67/ 73684	0.00101	0.998	0.0563	0.018	0.00289	
46	Serum albumin	ALBU_HUMAN	14%	98	5.92/ 71317	6.03/ 47327	0.00194	0.042	0.0026	0.025	0.0571	
47	-	-	-	-	-	5.59/ 49208	0.00196	0.0954	0.00335	0.671	0.995	
48	Serum albumin	ALBU_HUMAN	8%	195	5.92/ 71317	5.88/ 46450	0.00285	0.999	0.187	0.111	0.0049	

49	Serum albumin	ALBU_HUMAN	16%	289	5.92/ 71317	5.88/ 72105	0.00295	0.0504	0.00505	0.0436	0.0244	
50	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	24%	153	5.37/ 46878	4.95/ 62220	0.00323	0.00353	0.274	0.0611	0.0752	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	5%	40	5.92/ 71317							
51	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	37%	208	5.56/ 30759	5.33/ 59200	0.00333	1	0.131	0.351	0.0417	
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	7%	70	5.92/ 71317							
	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	35%	57	5.58/ 11773							
	Ig lambda-1 chain C regions	LAC1_HUMAN	14%	55	7.89/ 11512							
	Matrix metalloproteinase-9	MMP9_HUMAN	1%	20	5.69/ 79492							
52	Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	11%	96	5.28/ 12782	5.28/ 28077	0.00338	1	0.00914	0.073	0.0371	
	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	K1C10_HUMAN	7%	29	5.09/ 13486							

53	-	-	-	-	-	5.30/ 55102	0	0	0	0	0	
54	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	25%	325	5.56/ 30759	5.62/ 25588	0.00391	0.00691	0.0939	0.0261	0.0474	
55	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	10%	172	6.81/ 79294	6.38/ 93077	0.00599	0.0896	0.191	0.603	0.396	
	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	17%	74	6.35/ 49960							
56	Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	11%	83	5.28/ 12782	6.71/ 27235	0.00774	0.018	0.051	0.112	0.0396	
	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	64%	79	5.58/ 11773							
	Ig kappa chain V-III region HAH	KV312_HUMAN	12%	60	7.74/ 14178							
	Ig kappa chain V-III region SIE	KV302_HUMAN	32%	58	8.70/ 11882							
	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	KV401_HUMAN	7%	52	5.09/ 13486							
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	3%	45	5.92/ 71317							

Ig kappa chain V-I region EU	KV106 HUMAN	10%	42	8.62/ 11895							
Ig kappa chain V-I region Lay	KV113 HUMAN	8%	35	7.96/ 11941							
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	KV303 HUMAN	9%	35	6.29/ 10836							

Tabla A3. Agrupamiento de manchas de acuerdo a su tendencia y proteínas identificadas por cluster.

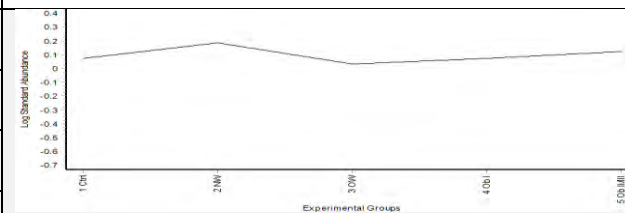
Grupo	Spot	Q	Proteínas	Frecuencia	Gráficas
Fracción de proteínas poco abundantes					
1	42, 44, 57, 56, 25, 14, 37, 26, 24, 54, 33	25.3	Kininogen-1	3	
			Hemopexin	3	
			Alpha-1B-glycoprotein	2	
			Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	2	
			Vitamin D-binding protein	2	
			Ceruloplasmin	2	
			Zinc-alpha-2-glycoprotein	2	
			Antithrombin-III	1	
			Vitronectin	1	
			Alpha-2-HS-glycoprotein	1	
			Alpha-2-antiplasmin	1	
			Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1	
			Alpha-1-antichymotrypsin	1	
			Complement factor I	1	
Clusterin	1				

			Glutathione peroxidase 3	1	
2	5, 34, 4	60	Alpha-1-antichymotrypsin	2	
			Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1	
			Coiled-coil domain-containing protein 87	1	
3	50, 39, 23, 2, 46	62.2	Coiled-coil domain-containing protein 87	1	
			Complement factor H	1	
			Hemopexin	1	
4	55, 48, 6, 11	87.9	Complement factor B	2	
			Ceruloplasmin	2	
			Coiled-coil domain-containing protein 87	2	
			Hemopexin	1	
			Plasma protease C1 inhibitor	1	
			Lymphoid-restricted membrane protein	1	
			Complement factor H	1	

			Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1	
5	52, 32	96	Kininogen-1	2	
			Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	2	
			Alpha-2-HS-glycoprotein	1	
6	-	0	-	0	
7	30, 1, 38, 51, 18	49	Hemopexin	1	
			Ceruloplasmin	1	
			Coiled-coil domain-containing protein 87	1	
			Vitamin D-binding protein	1	
			Complement factor I	1	
			Beta-2-glycoprotein	1	
			Vitronectin	1	
8	12, 36, 3, 35	66.2	Hemopexin	2	
			Complement C4-A	2	
			Zinc-alpha-2-glycoprotein	1	
			Glutathione peroxidase 3	1	
			Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1	

			MAGUK p55 subfamily member 2	1	
			Apolipoprotein A-IV	1	
			Alpha-1B-glycoprotein	1	
			Clusterin	1	
			Complement factor I	1	
9	8, 10, 19, 28, 31	72.4	Apolipoprotein A-IV	3	
			Complement C4-B	2	
			Alpha-1B-glycoprotein	2	
			Hemopexin	2	
			Rhox homeobox family member 1	1	
			Clusterin	1	
			Complement factor I	1	
			Histidine-rich glycoprotein	1	
10	16, 22, 29, 40, 53, 7, 17, 9, 43, 20	32.1	Hemopexin	3	
			Alpha-1-antichymotrypsin	2	
			Vitronectin	2	
			Kininogen-1	2	
			Complement C4-B	1	
			Alpha-1B-glycoprotein	1	

			Ceruloplasmin	1
			Antithrombin-III	1
			Angiotensinogen	1
			Beta-2-glycoprotein 1	1
			Protein AMBP	1
			Complement C4-A	1
			Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1
			Pigment epithelium-derived factor	1
			Ig kappa chain V-II	1
			Ig kappa chain C region	1
			Ig kappa chain V-III	1
			Ig kappa chain V-I	1
			Ig lambda-2 chain C regions	1
			Coiled-coil domain-containing protein 87	1
11	47	0	Hemopexin	1
			Alpha-1-antichymotrypsin	1
			Vitronectin	1
			Beta-2-glycoprotein 1	1
			Kininogen-1	1



			Ceruloplasmin	1	
12	45, 27, 13, 49, 41, 21, 15	17	Hemopexin	4	
			-	3	
			Complement C4-B	1	
			Ceruloplasmin	1	
			Alpha-1-antichymotrypsin	1	
			Complement C4-A	1	
			Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1	
			Dermcidin	1	
			Coiled-coil domain-containing protein 87	1	
Fración de proteínas abundantes					
1	53, 46, 49, 17, 22, 12, 54	72.8	Serum albumin	5	
			Haptoglobin	1	
			14-3-3 protein beta/alpha	1	
			Serotransferrin	1	
			Apolipoprotein A-I	1	
2	30, 41, 3, 34, 39, 27	78.1	Serum albumin	2	
			Haptoglobin	2	

			Haptoglobin-related protein	1	
			Ig kappa chain C region	1	
3	47, 1, 5, 31, 43	68	Serum albumin	4	
			Dermcidin	1	
			Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	1	
4	45, 18, 37, 26, 29, 48	85.7	Serum albumin	6	
			Otopetrin-3	1	
			Serotransferrin	1	
			Dermcidin	1	
			Transthyretin	1	
5	-	0	-	0	

6	7	0	-	0	
7	55, 23, 51, 33	66.4	Serum albumin	2	
			Serotransferrin	1	
			Ig mu chain C region	1	
			Ig alpha-1 chain C region	1	
			Apolipoprotein A-I	1	
			Ig kappa chain C region	1	
			Ig lambda-1 chain C regions	1	
			Matrix metalloproteinase-9	1	
Transthyretin	1				
8	35, 16, 20, 24, 14, 10, 11, 15, 44, 13, 42	81	Serum albumin	5	
			Serotransferrin	4	
			Ig alpha-1 chain C region	4	
			Ig mu chain C region	2	
			Ig alpha-2 chain C region	2	

			14-3-3 protein beta/alpha	1	
			Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	1	
			Dermcidin	1	
			Alpha-1-antitrypsin	1	
			Apolipoprotein A-I	1	
9	50, 21, 4, 9, 2, 25, 38, 28, 8, 19, 6, 36, 40, 32, 52, 56	60.3	Haptoglobin	9	
			Serum albumin	5	
			Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	4	
			Ig kappa chain V-II region Cum	4	
			Ig kappa chain C region	3	
			Ig kappa chain V-I region Lay	2	
			Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	2	
			Alpha-1-antitrypsin	1	
			Dermcidin	1	
			Apolipoprotein A-I	1	
			C-X-C motif chemokine	1	
			Oncoprotein-induced transcript 3 protein	1	
			Ig kappa chain V-III region SIE	1	

			Ig lambda-1 chain C regions	1	
			Ig lambda chain V-I region HA	1	
			Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	1	
			Ig lambda-2 chain C regions	1	
			Ig kappa chain V-III region HAH	1	
			Ig kappa chain V-III region SIE	1	
			Ig kappa chain V-I region EU	1	