



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Búsqueda de Marcadores Moleculares en
Biopsias de Pacientes con Cáncer Cérvico-
Uterino**

Tesis que presenta

Erika Patricia Briones Cerecero

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2005.



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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 009 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 1 días del mes de agosto del año 2005, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretario	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Erika Patricia Briones Cerecero

sobre la Tesis intitulada:

Búsqueda de Marcadores Moleculares en Biopsias de Pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino

que se desarrolló bajo la dirección de

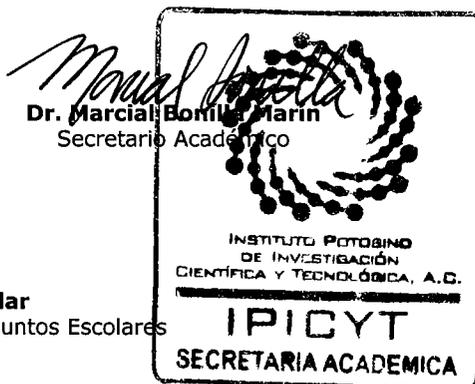
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes agosto de 2005.




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Erika Patricia Briones Cerecero y aprobada el 1 de agosto de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Rubén López Revilla
Presidente



Dra. Leticia Santos Martínez
Secretario



Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Vocal

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica del Departamento 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 la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (185816), y apoyos financieros de FOMIX – Gto. Y FOMIX – S.L.P.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES JOSÉ ASUNCIÓN Y JUANA MARÍA,
A MIS HERMANOS RODOLFO Y RENÉ,
A MI NOVIO ANDRÉS,
A MI ABUELITA ANA MARIA,
A MIS TÍOS Y PRIMOS,
A MI TIO RODOLFO,
A MIS AMIGOS OLGA, EDWARD, LUPITA,
A MIS AMIGOS DEL IPICYT

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por su tiempo y dedicación, por guiarme en el camino de la investigación.

Al Dr. Antonio de León por su apoyo y disposición en la revisión de la tesis.

Al Dr. Rubén López Revilla por sus comentarios en la realización de esta tesis

A la Dra. Leticia Santos Martínez por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Mauricio Salcedo por su apoyo y orientación en la realización de la tesis.

A la Dra. Fonseca Castañol, al Dr. Sánchez Hermosillo, Dr. Castelo, Dr. Ortiz Valdez y a los Drs. Del Hospital Central por su apoyo en la recolección de muestras.

Al M.C. Raymundo Méndez de Acceso Lab y a M.C. Adriana Mata de BioRad por su asesoría técnica

A mis compañeros de laboratorio, Yadira, Sara, Lulu, Ana, Ceci, Midory por su apoyo durante mi trabajo en el laboratorio.

A todas las personas involucradas en la realización de esta tesis.

INDICE

	Página
Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCION	3
1.1 Factores de Riesgo	6
1.2 Virus del papiloma humano	7
1.3 Organización del genoma de los VPH	8
1.4 Clasificación de los VPH	11
1.5 Detección de VPH	12
1.6 Proteómica	14
1.7 Identificación de proteínas	16
1.8 Aplicaciones de la proteómica	17
II. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivo específico	
III. MATERIAES Y METODOS	20
3.1 Obtención de las muestras	20
3.2 Extracción de proteínas	21
3.3 Cuantificación de proteínas	21

3.4 Electroforesis bidimensional	24
3.5 Tinciones.	26
3.6 Identificación de proteínas	28
IV. RESULTADOS	29
4.1 Preparación de la muestra	29
4.2 Cuantificación de la muestra	30
4.3 Electroforesis Bidimensional	31
4.4 Análisis de los geles	35
4.5 Espectrometría de masas	39
V. DISCUSION	43
VI. REFERENCIAS	45
VII. APENDICE	50

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Número de casos nuevos de neoplasia maligna y defunciones por país.	4
2. Progresión en cáncer cervicouterino	5
3. Sistema de clasificación de las lesiones premalignas	6
4. Función de los diferentes genes del VPH	11
5. Correspondencia entre el tipo de VPH y la enfermedad que produce.	13
6. Curva de calibración 2D Quant Kit	22
7. Curva de calibración Método de Bradford	23
8. Programación del equipo Ettan IPG phor	25
9. Preparación de geles para la segunda dimensión.	25
10. Lista de los pesos moleculares y puntos isoelectricos de las manchas más representativas	39
11. Datos obtenidos por medio del software Mascot	40

LISTA DE FIGURAS

	Paginas
1. Aspecto de la cápside icosaédrica de un VPH, observándose las unidades pentaméricas.	8
2. Organización del genoma de los VPH	9
3. Integración del genoma del VPH en el cromosoma celular con la delección de E2 Y E4.	11
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en donde se observa la interferencia por otros componentes.	29
5. Gel de poliacrilamida al 15% mostrando la eliminación de interferencias.	30
6. Gel arcrilamida al 15% bidimensional utilizando tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 10.	32
7. Geles bidimensionales de proteínas extraídas de tejido normal, tejido con NIC 3 y tejido con CaCu invasor.	33
8. Geles de poliacrilamida de tejido normal reproducibilidad.	34
9. Análisis de la intensidad de las manchas	36
10. Analisis de los geles bidimensionales utilizando el software PDQuest Muestras control vs . NIC3.	37

11. Analisis de los geles bidimensionales utilizando el software PDQuest Muestras control vs . CaCU invasor.	38
12. Resultados del análisis realizado por medio de BLAST.	41
13. Escisión de manchas de interés.	41
14. Resultados obtenidos de la base de datos Mascot a partir de los datos generados por espectrometría de masas.	42

RESUMEN

El análisis de muestras de tumores por tecnología proteómica, plataforma que combina la electroforesis de dos dimensiones y el análisis de espectrometría de masas es un enfoque prometedor para la caracterización molecular del cáncer. El cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad en la mujer mexicana. Para el año 2000, el registro histopatológico de neoplasias informó un total de 4620 defunciones, con una tasa de 13.6 por cada 100 000 mujeres. El propósito de este trabajo fue llevar a cabo la comparación de los patrones proteínicos de biopsias de tejido cervical normal y de tejidos con lesiones de alto grado (NIC3 y CaCU) mediante el uso de la proteómica. Se obtuvieron los patrones proteínicos con un promedio de 315 manchas para las muestras de tejido normal, 390 manchas en las muestras de NIC 3 y 530 para las muestras de CaCU invasor. Las diferencias más representativas en la expresión de proteínas fueron encontradas en los rangos de pH de 5.5 a 7 y pesos moleculares entre 10 y 30 kDa. Las manchas diferenciales fueron enviadas para ser caracterizadas por espectrometría de masas. Hasta el momento se detectó una proteína con un peso molecular aproximado de 24 kDa y un pI de 6.5. Los resultados obtenidos de la base de datos indican una proteína que probablemente corresponde a una cadena ligera (kappa) de una Inmunoglobulina (IgG).

ABSTRACT

Analysis of tumor samples by proteomic technology, which combines two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analysis, is a promising approach for molecular characterization of cancer. Cervical cancer (CC) is the first cause of death by neoplasias in Mexican women. In the year 2000, the histopathological registry of neoplasias reported a total of 4620 deaths, with a rate of 13.6 per 100,000 women. The purpose of this study was the comparison of the bidimensional protein patterns of biopsies from normal cervical tissue against cervical tissue showing different levels of Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 (CIN3) and CC. Once obtained, the protein patterns were analyzed with the software PDQuest. A mean of 315 spots were detected in the normal tissue samples, 390 spots in the CIN 3 samples and 530 in the invasive CC samples. The most significant differences in the protein expression were found in the pH range of 5.5 to 7 and a molecular weight between 10 and 30 kDa. The differential spots were characterized by mass spectrometry. The first protein identified has a molecular weight of 24 kDa and isoelectric point of 6.5. The results obtained from the database indicate a probable light chain (κ) from one immunoglobulin (IgG).

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de la evolución de lesiones precursoras lentas y progresivas. Las etapas se clasifican en displasia leve, moderada y severa, evolucionando a cáncer *in situ*, en grado variable cuando esta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal. (Suárez y col. 2005)

En el año 2000, se detectaron 470,606 nuevos casos y 233,372 defunciones a causa del CaCU entre las mujeres a nivel mundial. Además, se estimó que más del 80% de los casos se presentaría en los países menos desarrollados, donde esta enfermedad es la principal neoplasia maligna entre las mujeres. En el continente Americano, se pronosticaron 92,136 casos y 37,640 defunciones por CaCU, de los cuales 83,9 y 81,2 % corresponden a América Latina y el Caribe respectivamente. Hoy en día, el CaCU sigue siendo una causa preponderante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial, aunque es la neoplasia con el mayor potencial demostrado de prevención secundaria (PATH 2004).

En México, el CaCU es un problema de salud pública y es la segunda causa de muerte por cáncer entre mujeres mayores de 35 años. (Tabla 1)

Tabla 1.- Número de casos nuevos de neoplasia maligna y defunciones por país con tasas estandarizadas por edades por cada 100,000 habitantes en 2000

País	Casos Nuevos	Defunciones	Tasa de Incidencia	Tasa de Mortalidad
Argentina	2953	1585	14,2	7,6
Bolivia	1807	661	58,1	22,2
Brasil	24445	8815	31,3	11,6
Canadá	1608	650	8,2	2,8
Chile	2321	860	29,2	10,6
Colombia	5901	2339	32,9	13,7
Costa Rica	424	197	25,0	12,1
Cuba	1586	730	23,8	10,6
Haití	2428	1326	93,9	53,5
Hondura	833	329	39,6	16,8
Jamaica	489	209	43,4	18,4
México	16448	6650	40,5	17,1
Perú	4101	1575	39,9	15,8
Estados Unidos	13230	6417	7,8	3,3
Venezuela	3904	1454	38,3	15,2

(PATH 2004).

La evolución a cáncer invasor, puede durar hasta 20 años y no todas las mujeres que presentan las lesiones precursoras desarrollan la forma invasora de esta enfermedad (Tabla 2). Uno de los avances más importantes en la detección de la neoplasia de cérvix ha sido la identificación del grado de las lesiones precursoras, las cuales han sido objeto de diferentes clasificaciones. La primera clasificación se realizó en 1930 y se denominó displasia. De acuerdo a su gravedad se denomina: leve, moderada o severa. En 1968 se acuñó el concepto de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), con diferentes grados: NIC 1, NIC 2, NIC 3 o carcinoma *in situ*. En esta clasificación el porcentaje de epitelio involucrado en la lesión define el grado de la misma, correspondiendo la displasia leve al NIC 1, la moderada al NIC 2 y la severa al

NIC 3 (Hadzic y col. 1999; Broso y col. 1993). La clasificación más reciente fue la desarrollada en 1988 y se conoce como el Sistema Bethesda, utilizando el concepto de lesiones escamosas intraepiteliales. Las lesiones se subdividen en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LIEGA). En las LEIBG quedan incluidas las infecciones por papilomavirus humano (VPH) y la displasia leve o NIC 1. Las displasias moderada y severa o NIC 2 y 3 quedan agrupadas en las LEIAG (Broso y col. 1993). Las equivalencias de los tres sistemas de clasificación se observan en la Tabla 3. El Sistema Bethesda contempla además una nueva categoría, las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Estas células no satisfacen los criterios de las LEIBG; sin embargo, presentan anomalías menores que anteriormente se clasificaban como atípicas. (Cox y col. 1999 y 1995.)

Tabla 2. Progresión en cáncer cervicouterino

Infección con VPH	Displasia leve*	Displasia severa	Cáncer Cervicouterino
Extremadamente común entre mujeres en edad reproductiva. Un pequeño porcentaje de los casos lleva a cambios celulares anormales.	Son usualmente temporales. Sin embargo algunos casos, progresan a displasia severa.	La displasia severa es menos común. Puede progresar a cáncer en 10 – 15 años.	Es más común entre mujeres entre 50 y 60 años.

* Displasia se refiere a células anormales en tejido de cérvix.

Tabla 3.- Sistemas de clasificación de las lesiones premalignas.

Displasias/CIS Años 49 - 69	¿VPH?	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia grave	CIS
CIN – NIC (Richard) Años 69 - 89	VPH (1976)	CIN – NIC 1	CIN – NIC 2	CIN – NIC 3	
SIL-LIP (Bethesda) Desde 1989	SIL-LIP BAJO GRADO (L-SIL)		SIL-LIP ALTO GRADO (H-SIL)		

(Lacruz 2003)

1.1 FACTORES DE RIESGO

Se ha demostrado que la infección por el papilomavirus humano (VPH) es la causa necesaria, pero no la única en CaCU (Walboomers y col. 1999). A pesar de la gran mayoría de las mujeres se infecta por algún tipo de VPH oncogénico, nunca presentan CaCU. Esto sugiere que otros factores adicionales que actúan conjuntamente con el VPH influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad.

Los factores principales que contribuyen al desarrollo de CaCU:

- **Multiparidad.** Las mujeres con tres o cuatro embarazos de término tienen un riesgo 2,6 veces más alto de aparición de cáncer cervicouterino que aquellas que nunca han dado a luz. (Muñoz y col. 2002).

- No hacerse la prueba de detección de CaCU periódicamente (Papanicolaou).
- Anticonceptivos orales. Un estudio realizado sugiere que el uso a largo plazo de los podría aumentar hasta cuatro veces el riesgo de CaCU en las mujeres infectadas con el VPH (Moreno y col. 2002).
- El tabaquismo parece estar firmemente asociado con la aparición de lesiones cervicales precancerosas y cáncer. Los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras actuales al menos duplica el de las no fumadoras.
- Las mujeres con una baja condición socioeconómica a menudo tienen bajos ingresos, limitaciones para acceder a los servicios de atención de salud, factores nutricionales y escasa concientización acerca de los temas de salud y de una conducta preventiva (Santos y col. 1997).
- Las relaciones sexuales a una edad temprana (Ho y col., 1998), tener múltiples parejas sexuales, o tener contacto sexual con alguien que ha tenido parejas sexuales múltiples (Muñoz y col., 1992).
- La inmunosupresión por infección con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) la cual puede causar una progresión mas rápida de las lesiones intraepiteliales cervicales a carcinoma (Obstet Gynecol 1998).
- La obesidad incrementar el riesgo de CaCu (Albanes, 1987; Wolk, 2001; Ursin y col., 1996; Parazzini y col. 1988).

1.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH es una infección de transmisión sexual (ITS) que en muchos casos es asintomática. El factor de riesgo más común del CaCU es la

- La obesidad incrementar el riesgo de CaCu (Albanes, 1987; Wolk, 2001; Ursin y col., 1996; Parazzini y col. 1988).

1.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH es una infección de transmisión sexual (ITS) que en muchos casos es asintomática. El factor de riesgo más común del CaCU es la exposición a ciertas variedades del Papillomavirus Humano (VPH) de alto riesgo (PATH 2000).

El VPH es un virus compuesto de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8Kb (Zur Hausen, 1999; Terai y Burk., 2001). Y pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Se han descrito más de 150 genotipos relacionados, de los cuales aproximadamente 85 han sido completamente secuenciados.

El VPH es un virus pequeño (55-60 nm de diámetro) sin cubierta (Shanley, 2002). La cápside icosaédrica está formada por 72 subunidades pentáméricas. (Figura 1).

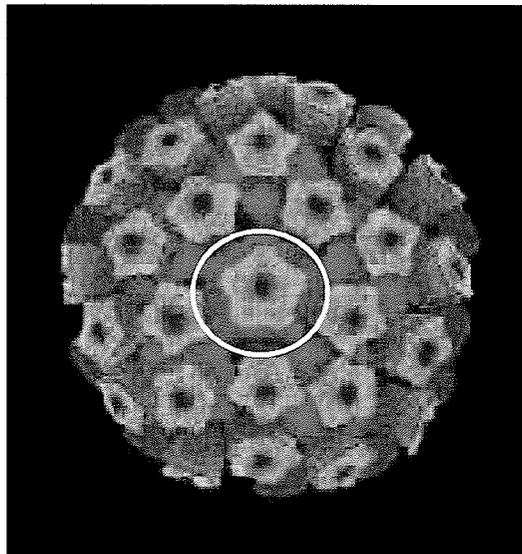
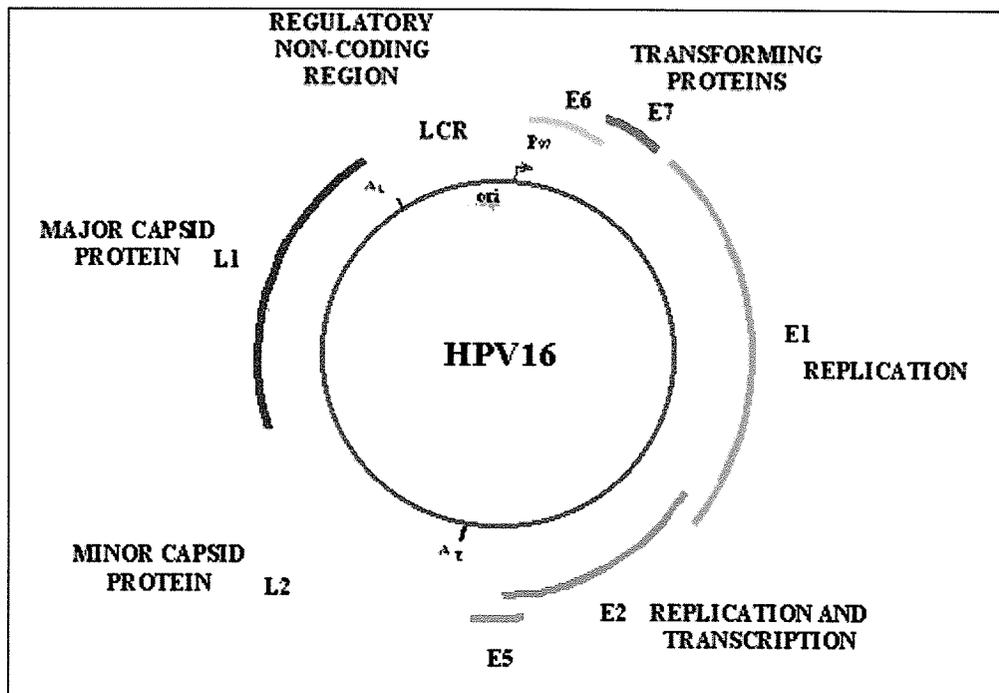


Figura 1: Aspecto de la cápside icosaédrica de un VPH, observándose las unidades pentaméricas

1.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE LOS VPH

La organización del genoma de los papilomavirus (Figura 2) es similar y consta de una región temprana (E, early) que codifica de 6 a 7 proteínas tempranas (E6, E7, E1, E2, E4 (E8) y E5), una región tardía (L, late) que codifica 2 proteínas tardías (L1 y L2) y 2 regiones regulatorias, denominadas región larga de control (LCR long control region) y región pequeña no codificante (Seedorf y col., 1985).



La proteína trans-membranal E5 modula la actividad del factor de crecimiento epitelial (EGF). La proteína E4 interactúa con filamentos de citoqueratina y los desestabiliza, provocando la muerte celular (Bosch y col. 2002).

Los virus no son formas de vida independientes y requieren de la célula huésped para su replicación. Por ello desarrollan mecanismos que implican cambios importantes en la regulación del crecimiento celular, comportándose, en ocasiones como virus transformantes. El VPH realiza esta función a través de la expresión de los genes E6 y E7.

La proteína E6 regula la degradación de la proteína supresora de tumores p53, la inactivación de p53 inhibe la apoptosis y permite que la célula proliferen y facilita que el virus complete su ciclo. La E7 se liga al producto génico del retinoblastoma (Rb). La función de E7 es básicamente la de un "mitógeno" al incrementar la dinámica del crecimiento celular (Zur Hausen, 1996; Zwerschke y Jansen-Dürr, 2000). En la Tabla 4 se muestra un resumen de las funciones de los diferentes genes.

El ADN del VPH se integra frecuentemente al genoma de la célula hospedadora y la transforma. Este fenómeno suele producir la delección del gen E2 el cual pierde su función represora y conduce a la sobreexpresión de E6 y E7 (Bosch y col. 2004) (Figura 3).

El ADN del VPH se integra frecuentemente al genoma de la célula hospedadora y la transforma. Este fenómeno suele producir la delección del gen E2 el cual pierde su función represora y conduce a la sobreexpresión de E6 y E7 (Bosch y col. 2004) (Figura 3).

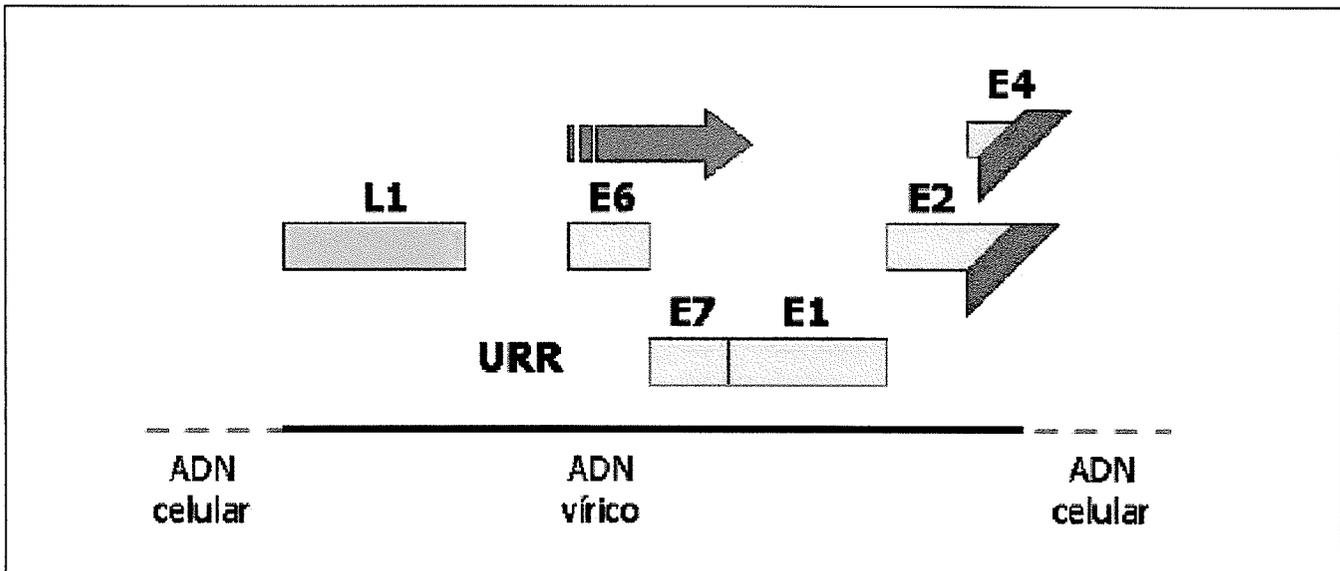


Figura 3. Integración del genoma del VPH en el cromosoma celular con la delección de E2 y E4.

Tabla 4.- Función de los genes del VPH involucrados en el desarrollo de CaCU

Gen	Función
E1	Iniciación de la replicación del ADN
E2	Regulación transcripcional y replicación del ADN
E4	Ruptura del citoesqueleto
E5	Proteína transformante que interactúa con receptores de factores de crecimiento
E6	Proteína transformante, se une a p53, e induce su degradación
E7	Proteína transformante, se une a Rb y libera el factor de transcripción EF2

condilomas, lesiones intraepiteliales y neoplasias invasivas, los VPHs genitales se han dividido en tres grupos: los asociados con lesiones benignas o de bajo riesgo (VPH 6, 11, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 53-55, 57, 66) y los asociados con lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) y carcinomas invasivos divididos a su vez en un grupo de riesgo intermedio (VPH 31, 33, 35, 51, 52) y un grupo de alto riesgo oncogénico (VPH 16, 18, 45, 46) (Kurgan, 1994; McCance y col. 1998; Cooper y col. 1997). Los VPH más comunes y sus lesiones asociadas aparecen en la tabla 5 (Kurman, 1994; Beutner y col. 1997).

Debido a que el tipo 16, es el de mayor prevalencia, encontrándose entre el 50 a 60 % de los casos de CaCU actualmente existen 5 grupos filogenéticos del VPH 16 basada en el fragmento LCR: Europeo (E), Asiático (As), Asiático Americano (AA), Africano-1 (Af-1) y el Africano-2 (Af-2) (Ho y col., 1991 y 1993; Chan y col., 1992).

1.5 DETECCION DE VPH

1.5.1 PAPANICOLAOU

El método principal de detección para este tipo de cáncer es el Papanicolaou que consiste hacer un raspado del cérvix para comprobar la presencia de células cancerosas en el cuello uterino.

1.5.2 COLPOSCOPIA.

Es un procedimiento diagnóstico, que consiste en la visualización directa del cérvix a través de un sistema de ampliación utilizando diferentes grados de magnificación provisto de una fuente de luz, para observar detalles del epitelio

y vasos sanguíneos. Antes de iniciar el estudio, es necesaria la aplicación de ácido acético al 3 ó 5% para ayudar a discriminar el epitelio normal del anormal (Ferris, 1997; Dexeus y col. 2002). El ácido acético se aplica directamente en el cérvix. En los epitelios dañados hay un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, lo que permite que el ácido penetre y cause aglutinación de proteínas, fenómeno responsable del color blanco que toma el epitelio afectado (Ferris, 1994).

Tabla 5. Correspondencia entre el tipo de virus de VPH y la enfermedad.

Enfermedad	Tipos de VPH
Verrugas plantares	1*, 2*, 4, 63
Verrugas comunes	1*, 2*, 4, 26, 27, 29, 41†, 57, 65, 77
Verrugas comunes de los manipuladores de carnes	1, 2*, 3, 4, 7*, 10, 28
Verrugas planas	3*, 10*, 27, 38, 41†, 49, 75, 76
Verrugas intermedias	10*, 26, 28
Epidermodisplasia verruciforme	2*, 3*, 5*, 8*†, 9*, 10*, 12*, 14*†, 15* 17*†, 19, 20†, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38†, 47, 50
Condiloma acuminado	6*, 11*, 30†, 42, 43, 44, 45†, 51†, 54, 55, 70
Neoplasias intraepiteliales	
No caracterizadas	30†, 34, 39†, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66†, 67, 68, 69, 70, 71, 74
De bajo grado	6*, 11*, 16†, 18, 31†, 33†, 33†, 35†, 42, 43, 44, 45†, 51†, 52†
De alto grado	6, 11, 16*†, 31†, 33†, 35†, 39†, 42, 44, 45†, 51†, 52†, 56†, 58†, 66†
Enfermedad de Bowen	16*†, 31†, 34
Papulosis bowenoide	16*†, 34, 39†, 42, 45†, 55
Carcinoma de cérvix	16*†, 18*†, 31†, 33†, 35†, 39†, 45†, 51†, 52†, 56†, 58†, 66†
Papilomas laríngeos	6*, 11*
Hiperplasia epitelial local de Heck	13*, 32*
Papilomas conjuntivales	6*, 11*, 16*†
Otros	6, 11, 16†, 30†, 33†, 36, 37, 38†, 41†, 48†, 60, 72, 73

* Asociaciones más frecuentes.

† Alto potencial maligno (Harrison y col 1998).

1.5.3 TECNICAS DE DETECCION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE VPH

El VPH no se puede cultivar de manera confiable en un laboratorio; por consiguiente, las pruebas del VPH dependen de las técnicas moleculares que detectan el ADN del VPH en las muestras cervicales. Considerando que hay muchísimos tipos del VPH con un potencial carcinogénico diferente, las pruebas del VPH sirven para determinar si están presentes uno o varios tipos de alto riesgo en una muestra.

Actualmente se cuenta con diferentes técnicas de detección de VPH tales como:

1. Hibridación *in situ*
2. Southern blot
3. Dot blot
4. Hibridación con mezcla de sondas específicas de alto y bajo riesgo
5. Secuenciación
6. PCR en tiempo real

1.6 PROTEÓMICA

La proteómica es junto a la genómica, una de las nuevas áreas de investigación que últimamente más interés están despertando. El auge actual de la proteómica se debe fundamentalmente; a la necesidad de descifrar esta gran cantidad de información genómica ha estimulado considerablemente el estudio directo y a gran escala de los productos codificados por los genes, es decir, las proteínas. De forma paralela se ha estimulado el desarrollo de

nuevas herramientas bioinformáticas para analizar y procesar esta información (Vázquez, 2004).

El término “proteoma” se usó por primera vez en 1994, para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma. El proteoma es un elemento altamente dinámico, cuyos componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular dados, como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, efectores o señales bioquímicas en su estado fisiológico o patológico. Estos factores incrementan de forma considerable la complejidad del proteoma, como consecuencia de la activación o supresión de la expresión de genes o los cambios en sus modificaciones postraduccionales. El proteoma de una célula es la expresión de su fenotipo característico, y las diferencias entre un tipo celular y otro, o entre un mismo tipo celular en diferentes situaciones (Torrades, 2004).

La tecnología más utilizada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) permite separar hasta miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. Esta técnica se basa en una separación de las proteínas en función de la carga (pI), seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular en presencia de SDS. (García 2004).

La proteómica abre nuevos horizontes en muchas áreas de investigación de las ciencias de la vida. Esto es particularmente verdadero para los esfuerzos de investigación en el campo de la medicina. La proteómica clínica

se puede definir como una subserie de actividades proteómicas en el campo de la medicina, que promete acelerar el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, y marcadores proteínicos de enfermedades (Vitzthum y col. 2005).

1.7 IDENTIFICACION DE PROTEINAS

La espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas a gran escala. Debido a su rapidez y elevada sensibilidad.

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de métodos de ionización para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa están formados por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector y mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa (García 2004).

Las fuentes de iones más comunes son MALDI (Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization) y ESI (Electrospray ionization), los iones producidos por cada método pueden ser detectados por: tiempo de vuelo (Time of Flight TOF), cuadrupo o transformada de Fourier (FT/MS) (Baxevanis y Oullette 2005).

El análisis de proteínas mediante espectrometría de masas requiere de su conversión en péptidos mediante proteólisis utilizando generalmente tripsina. (García 2004).

Mascot Software

Fue desarrollada por Matrix Science, es uno de los programas más populares para la identificación de la información generada por espectrometría de masas. Mascot utiliza para su búsqueda un algoritmo llamado MOWSE que compara las masas de péptido para cada entrada en la base de datos de secuencia con el juego de datos experimentales.

Mascot esta disponible en la web de forma limitada y en forma comercial y utiliza diferentes bases de datos para su búsqueda tales como; Swiss-Prot, NCBI y MSDB.

1.8 APLICACIONES DE LA PROTEOMICA EN EL AREA DE BIOCENCIAS.

En esta área, la Proteómica se ha aplicado fundamentalmente a tres tipos de estudios:

a.- La microcaracterización sistemática de proteínas, con el objetivo de abordar la identificación a gran escala de los componentes de un proteoma (Vázquez, 2004).

b.- La identificación de los componentes del proteoma que sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas o inducidas por agentes externos. Estos proyectos abordan la identificación de proteínas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas o señales bioquímicas o su estado fisiológico o patológico.

Los **biomarcadores** son una gran esperanza para la detección, diagnóstico y pronóstico de cáncer debido a su habilidad en la identificación de señales moleculares únicas de ciertos estados fisiopatológicos (Srivastava y Srivastava R. 2005). Cualquier proteína que se expresa diferencialmente en tejido con cáncer cuando se compara contra tejido normal, o cualquier proteína que se sabe que esta involucrada en proceso de cáncer, son buenos candidatos para biomarcadores de cáncer. Uno de los métodos estándar para identificar biomarcadores candidatos es comparar el perfil de transcripción de la enfermedad contra el tejido normal para identificar diferencialmente los transcritos expresados (Aebersold y col. 2005).

c.- La caracterización de las interacciones subcelulares existentes entre las proteínas y la determinación de los componentes de complejos macromoleculares. Estos proyectos pretenden investigar la función de las proteínas caracterizando las interacciones que sufren en el interior de la célula. (Vázquez, 2004).

La proteómica actualmente ha sido utilizada para la identificación de marcadores para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer, por ejemplo carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de ovario (Petricoin y col., 2002), cáncer de próstata (Meehan y col., 2002) y cáncer de esófago (Zhou y col., 2002). También puede ser utilizado para el análisis de fluidos corporales (suero, orina, fluidos cerebro espinal y líquido sinovial) (Kennedy S., 2001).

II OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener los patrones de expresión bidimensionales y caracterizar las proteínas expresadas diferencialmente en muestras de mujeres sanas y con diferentes grados de lesión (NIC3 y CaCU invasor).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la metodología para la obtención de patrones bidimensionales en tejidos sanos y con lesiones intraepiteliales (NIC3) y con CaCu invasor.
- Analizar los resultados para determinar que proteínas se encuentran aumentadas o disminuidas en su contenido en los diferentes grados de lesión.
- Identificar las proteínas diferenciales.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las biopsias utilizadas para la estandarización de la técnica fueron proporcionadas por el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, estas muestras se obtuvieron de pacientes con un Papanicolaou normal a quienes se les realizó histerectomía abdominal electiva debido a sangrado uterino anormal, poliposis o miomatosis.

Las muestras utilizadas para el estudio fueron proporcionadas por la Clínica de Displasias de la Secretaría de Salud Hospital “Juan H. Sánchez”. Las biopsias fueron tomadas cuando las pacientes acudieron a consulta después de obtener un resultado de lesión preneoplásica en la prueba de Papanicolaou. Las pacientes se sometieron a una colposcopia para la cual primero se limpia el cuello con una solución líquida (ácido acético 5%) que permite diferenciar la mucosa normal de la patológica, se tomaron las muestras de tejido aparentemente normal y tejido con lesión de cada paciente. Las biopsias del cérvix fueron tomadas por medio de colposcopia e inmediatamente la muestra fue congelada en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio. Para este estudio se utilizaron en total 10 muestras: 5 muestras control, 3 muestras con NIC 3 y 2 muestras con CaCU invasor. Las pacientes que se seleccionaron para realizar el análisis bidimensional de las biopsias de acuerdo a la encuesta realizada se encontraron los siguientes factores de riesgo: Rango de edad de 20 – 60 años, inicio de vida sexual activa de 14 a 20 años, número de parejas sexuales 1 – 3, todas las pacientes

paridad mayor de 4, uso de anticonceptivos, medio socioeconómico bajo y escolaridad primaria.

La recolección de las muestras se obtuvo con el consentimiento informado de las pacientes que contaban con historial clínico.

3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEINAS.

Protocolo de extracción de proteínas TCA/Acetona

Cada muestra de tejido se trató con la solución de extracción (10% TCA, 0.07% de 2ME en acetona), y se disgrega con ayuda de perlas de vidrio y un pistilo. Se sonicó durante 5 minutos con intervalos de 10 seg. Se dejó precipitar por 45 min. a -20° C, se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min a 4° C. Se decantó y lavó el pellet con 1 mL de acetona al 0.07% de 2 ME, 1 mM de Inhibidor de proteasas, 1 mM de nucleasas y 2 mM EDTA. Se mezcló en vortex y se dejó precipitar por 45 min. a -20° . Finalmente se centrifugó a 13 000 rpm por 10-15 min a 4° C. Se repite el lavado una vez más y la muestra se resuspendió la muestra en solución de rehidratación.

3.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Para la cuantificación de proteínas se probaron dos Kits: Plus One 2D Quant Kit (Amersham) y método Bradford.

a) Plus One 2D Quant Kit

1. Se preparó de una curva de acuerdo a la Tabla usando una solución estándar de suero de albumina bovina (BSA) 2 mg/ml. Como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración 2D Quant Kit

Numero de tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen de solución estándar de BSA (2 mg/ml)	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
Concentración de proteína	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

2. Cada muestra se preparó por duplicado con un volumen final de 30 µL de muestra por ensayo.
3. Se adicionó 500 µl de precipitante por tubo. Mezclar por vortex e incubar los tubos de 2-3 min. a temperatura ambiente.
4. Se adicionó 500 µl de co-precipitante. Mezclar por vortex o inversión.
5. Se centrifugó los tubos a un mínimo de 10 000 x g por 5 min.
6. Se decantó el sobrenadante, asegurándose de eliminar completamente si es necesario se puede centrifugar de nuevo y eliminar el exceso con una pipeta.
7. Se adicionó 100 µl del solución de cobre y 400 µl de agua des-ionizada a cada tubo. Dar vortex.
8. Se adicionar 1 ml de reactivo generador de color (Mezclar 100 partes del reactivo de color A con una parte del reactivo de color B).
9. Se incubó a temperatura ambiente por 15 – 20 min.
10. Leer la absorbancia a 480 nm usando agua como blanco.

b) Bradford

Curva de Calibración

1. Se preparó BSA a una concentración de 1.4 mg/mL.
2. Se prepararon las diluciones que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de curva de calibración por el Método de Bradford.

Tubo	Concentración mg/ml	BSA (μ l)	Agua (μ l)
1	0.0	0	200
2	0.2	29	171
3	0.4	57	143
4	0.6	86	114
5	0.8	114	86
6	1.0	143	57
7	1.2	171	29
8	1.4	200	0

3. Se adicionar 1 ml de la solución de Bradford en un tubo y agregar 20 μ l de cada dilución, todas las diluciones se hacen por duplicado o triplicado.
4. Se incubarán a temperatura ambiente por al menos 5 minutos. La absorbancia podría incrementarse con el paso del tiempo, las muestras se pueden incubar por no más de una hora a temperatura ambiente.
5. La lectura se realizó con una absorbancia a 595 nm.

Cuantificación de proteínas

1. Se adicionó 1 ml de la solución de Bradford en un tubo y agregar 20 μ l de muestra y para el blanco utilizar 1 ml de solución de Bradford.
2. Se incubó a temperatura ambiente por al menos 5 minutos. La absorbancia podría incrementarse con el paso del tiempo, las muestras se pueden incubar por no más de una hora a temperatura ambiente.
3. Se midió la absorbancia a 595 nm.

3.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

Primera dimension: Isoelectroenfoque

Las muestras fueron aplicadas junto con la solución de rehidratación (Apéndice A) en tiras con un rango pH 4 – 7 (Bio Rad) por un periodo de 12 hrs. y sujetas a isoelectroenfoque en el equipo IPG phor II IEF System (Amersham Biosciences).

Rehidratación de la tira. La muestra se resuspende en solución de rehidratación (Apéndice A). Se agregaron 125 µl de la muestra en la bandeja de rehidratación y la cubierta protectora del gel se retira de la tira empezando del extremo ácido al básico. La tira se coloca con el gel hacia abajo sumergiéndola en la muestra evitando la producción de burbujas. Para minimizar la evaporación y cristalización de la urea, se cubre la tira con 3 ml de aceite de cubierta (Amersham). La rehidratación se lleva a cabo a temperatura ambiente por 10 hrs, o bien toda la noche.

Para realizar la separación por punto isoelectrico, se colocó la charola de cerámica en el equipo Ettan IPGphor II y cada carril se llenó con 9 ml de aceite de cubierta, se transfirió la tira con el gel hacia arriba con el ánodo del lado positivo del equipo, se colocó las esponjas en cada extremo de la tira previamente hidratadas en 125 µl de agua destilada una vez colocadas las esponjas se colocó los electrodos asegurándose que estos tocaran la plataforma del equipo. Una vez que se armó el equipo este se programó en la modalidad Volt-hours (kVh) como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Programación del equipo Ettan IPGphor

Longitud de la tira	Rango de pH	Paso y modo de voltaje	Voltaje (V)	Volt-hours (kVh)
7 cm	4 - 7	1 Gradiente	500	0.01
		2 Gradiente	4000	5.6
		3 Step and Hold	5000	2.5
		Total		8.0

La tira puede ser congelada hasta por 2 meses a -20°C y de 6 meses a un año a -80°C .

Segunda dimension - SDS PAGE

Después de la separación por punto isoeléctrico se lleva a cabo la segunda dimensión que es separación por peso molecular (PM) en geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizante (Tabla 9).

Tabla 9. Preparación del gel de segunda dimensión

Componentes	Concentración
	15 %
Acrilamida	2.5 ml
Agua milliQ	1.2 ml
Tris HCl pH 8.8	1.3 ml
SDS 10 %	50 μl
Persulfato de amonio (PSA) 10%	50 μl
TEMED	2 μl
Total	5 ml

Componentes	4 %
Acrilamida	165 μl
Agua milliQ	750 μl
Tris HCl pH 6.8	315 μl
SDS 10 %	12.5 μl
Persulfato de amonio (PSA) 10%	6.5 μl
TEMED	1.25 μl
Total	1.25 ml

Equilibrio de la tira

Si la tira no es congelada se coloca en un tubo con 2 ml de solución de equilibrio (Apéndice C) por 15 min. y se agrega 0.1 g DTT (ditiotreitól) por cada 10 ml.

Colocar la tira equilibrada en el gel SDS

Una vez que se cumplió el tiempo de equilibrio de la tira se eliminó el exceso de solución con un papel filtro. Se colocó en el gel y se fijó con agarosa 0.5 % (Apéndice G). Las condiciones de corrida para la electroforesis son 10 mA por gel y una vez que entra al concentrador se aumenta a 20 mA por gel con un tiempo aproximado de 3 hrs. Utilizando un buffer de corrida (Apéndice H)

3.5 TINCIONES

La tinción se realizó por dos métodos a) Plata y con SYPRO Ruby.

a) Tinción con plata

Para la tinción con plata se utilizó el SilverXpress Silver Staining Kit (Invitrogen).

Ver soluciones en el apéndice I.

1. Se incubó el gel con la solución fijadora durante 20 min.
2. Se decantó la solución de fijado y se incubó el gel en 2 cambios de solución de sensibilizado.
3. Se decantó la solución de sensibilizado y lavó el gel con dos cambios de agua ultra pura de 10 min. cada uno.
4. Se incubó el gel en solución de teñido por 30 min.

5. Se decantar la solución de teñido y lavar el gel con dos cambios de agua ultra pura de 10 min. cada uno.
6. Se incubo el gel con la solución de desarrollo hasta que la intensidad de las manchas sea la deseada. (Aprox. 3 – 15 min.)
7. Se adiciono la solución de paro directamente al gel, cuando la intensidad sea la deseada.
8. Se decantó la solución de paro y lavar con agua ultra pura.
9. Se tomo la foto de los geles en el Gel – Doc scanner (Bio – Rad).
10. Se seleccionaron las manchas de interés.
11. Se cortaron las manchas.
12. Se destiñeron las manchas.

b) Tinción con SYPRO Ruby

1. Fijar el gel. Para geles de poliacrilamida ya sea de 1-D o 2-D, utilizar la siguiente solución:

- Metanol al 50%, ácido acético al 10%.

El gel se incubaba en la solución de fijado a temperatura ambiente por 15 minutos (30 minutos para geles de 2-D) y se repite.

2. Incubar el gel en SYPRO Ruby sin diluir. Para obtener una mejor tinción en los geles 1-D o 2-D, se incubaba el gel toda la noche con el SYPRO. Una excelente sensibilidad es lograda después 3-4 horas.
3. Lavar el gel. Para reducir el fondo fluorescente e incrementar la sensibilidad se hacen 2 lavados en metanol al 10% (o etanol), ácido acético al 7% por 30 minutos. El gel puede ser monitoreado periódicamente utilizando un transiluminador UV para determinar el nivel de fondo fluorescente adecuado.

4. Vista y fotografía del gel. La tinción con SYPRO Ruby tiene dos excitaciones máximas, una de aprox. 280 nm y otra de aprox. 450 nm, y tiene una emisión mínima cerca de 610 nm. Las proteínas teñidas con este colorante pueden ser visualizadas usando un transiluminador UV de 300 nm, un transiluminador azul claro o un escáner láser. La tinción una fotoestabilidad excepcional que permite largos tiempo de exposición para una máxima sensibilidad.

3.6 IDENTIFICACION DE PROTEINAS

Las machas de interés se cortaron manualmente de los geles más representativos, esto se realizó con la ayuda de una punta estéril. Inmediatamente después de cortar la mancha de interés, se destiñó y se almacenó con agua Milli Q en tubos Eppendorf.

Para el análisis de espectrometría de masas las manchas fueron enviados a CINVESTAV Unidad Irapuato y las muestras se manejadas por la responsable del servicio del sistema MALDI-TOF (Amersham). Las proteínas fueron reducidas y digeridas toda la noche a temperatura ambiente con tripsina a una relación final de 25:1 w/w. Los valores de masas obtenidos de la digestión trípica analizaron automáticamente en la base de datos utilizando el programa MASCOT, y las proteínas se identifican automáticamente comparando con la base de datos del genoma humano (<http://www-celera.com>), la Organización de Genoma Humano (<http://www.hugo-international.org/index.htm>) y la base de datos de genoma (<http://www.ncgr.org.gsdb>).

4. RESULTADOS

4.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Se compararon varias técnicas de preparación de la muestra reportadas en la literatura. Se realizaron diferentes métodos de extracción de proteínas como fue la extracción directa con diferentes buffers de lisis (urea 7.0 M, thiourea 2M, DTT 10 mM, IPG buffer pH 4 – 7 al 1%) (Bisca y col., 2004). También se utilizó el SBO2 (urea 9.8 M, CHAPS al 2%, IPG buffer pH 3 – 10 al 0.5%, DTT 65 mM), y se evaluó un kit comercial Plus One 2-D Clean-up Kit (Amersham), pero debido a la presencia de moco cervical y sangre, no se obtuvieron buenos resultados (Stasyt T. y col, 2001). En la Figura 4 podemos observar que hay otros componentes que interfieren en la migración de la proteína.

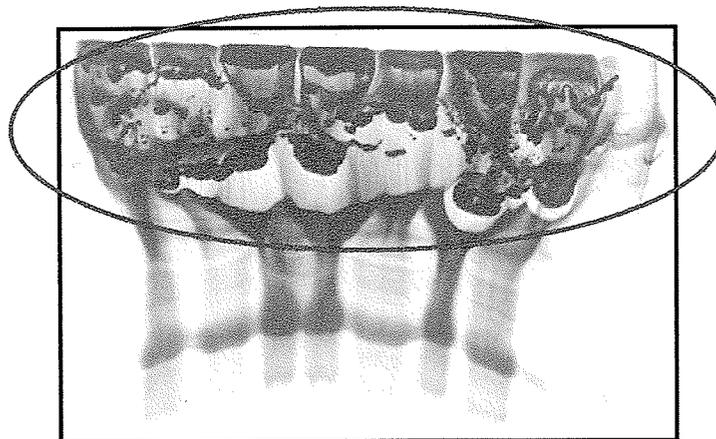


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en donde se observa la interferencia por otros componentes de la muestra (Buffer SB02).

Se evaluó un método de extracción con TCA/Acetona modificado (<http://www.noble.org>) con el cual se obtuvieron mejores resultados en la Figura 5 se muestra un gel SDS-PAGE al 15 % para evaluar la eliminación de otros compuestos que interfieren con la migración de las proteínas.

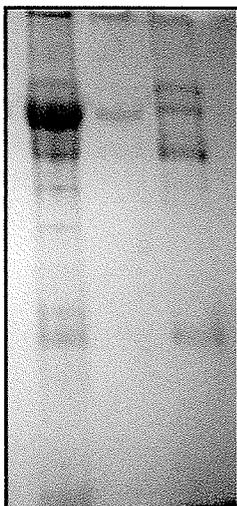


Figura 5. Gel poliacrilamida al 15 %. Se muestra la eliminación de interferencias en la migración de proteínas. Tinción con plata.

4.2 CUANTIFICACION DE LA MUESTRA

Para la cuantificación de proteínas se probaron dos métodos Bradford y Plus One 2D Quant kit (Amersham). Los reactivos utilizados en la preparación de la muestra tales como detergentes, agentes reductores, anfólitos, o la presencia de reactivos que forman complejos con el ion cúprico son incompatibles con otros ensayos de proteínas. El uso del kit 2D Quant dió resultados mas confiables, especialmente para las muestras que se diferencian en la composición de

detergentes. El ensayo se basa en la unión específica de iones de cobre a la proteína. Las proteínas se precipitan y se redisuelven en una solución que contiene cobre; el cobre libre se cuantifica como agente colorimétrico. En este trabajo se utilizó una cantidad de 50 µg por muestra.

4.3 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Trabajos reportados de diferentes neoplasias como cáncer de próstata, mama, ovario y renal (Bisca y col 2004; Brown y col 2002; Kellner y col. 2002), utilizaron tiras de 7 cm pH 3 – 10 para la separación por punto isoelectrico. Para SDS-PAGE se han utilizado geles de acrilamida al 15 – 16 % y la visualización de las proteínas es realizada por medio de tinción con plata o Sypro Rubi. Para este estudio se utilizaron las mismas condiciones, y para la detección se utilizó el kit Silver Quest/ Silver Stainig Kit (Invitrogen). Como se observa en la Figura 6, la mayor concentración de proteínas se encuentra en el centro del gel para obtener una mejor resolución de proteínas se cambió el rango de pH de la tira a pH 4 -7 de 7 cm y se utilizaron tiras de 11 cm. En la figura 7 se compara una muestra de tejido normal y 2 muestras de lesiones de diferentes grados (NIC3 y CaCU invasor). Se muestra un notable cambio en el contenido de proteínas.

La reproducibilidad de la técnica se evaluó corriendo las muestras por duplicado bajo las mismas condiciones, como se muestra en la Figura 8.

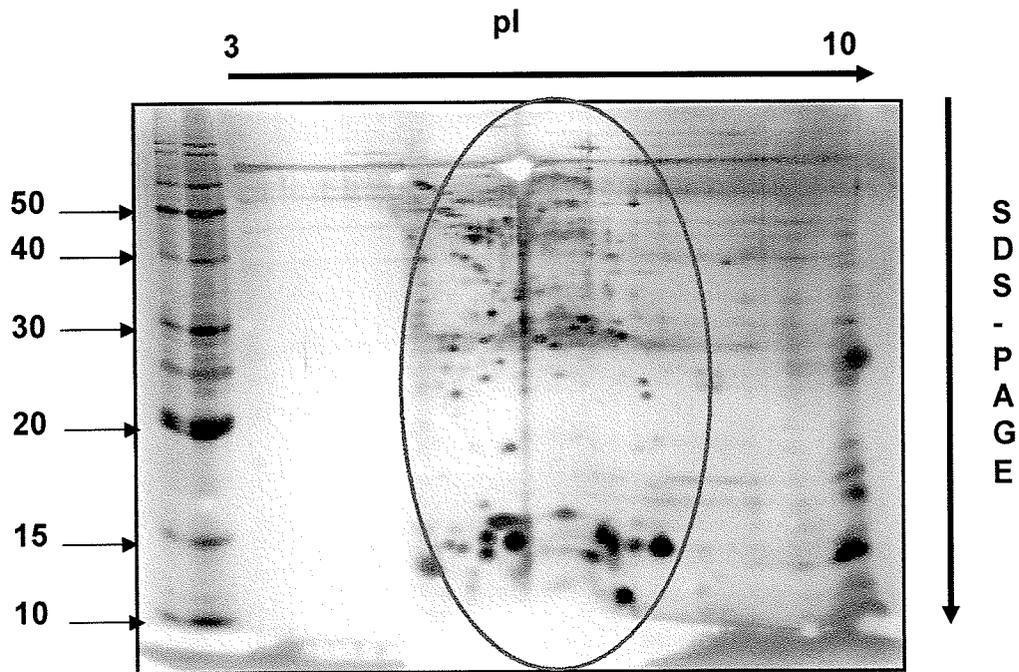


Figura 6. Gel de poliacrilamida al 15% utilizando tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 10. La mayor cantidad de proteínas de la biopsia se localizan en rango de pH central (ovalo).

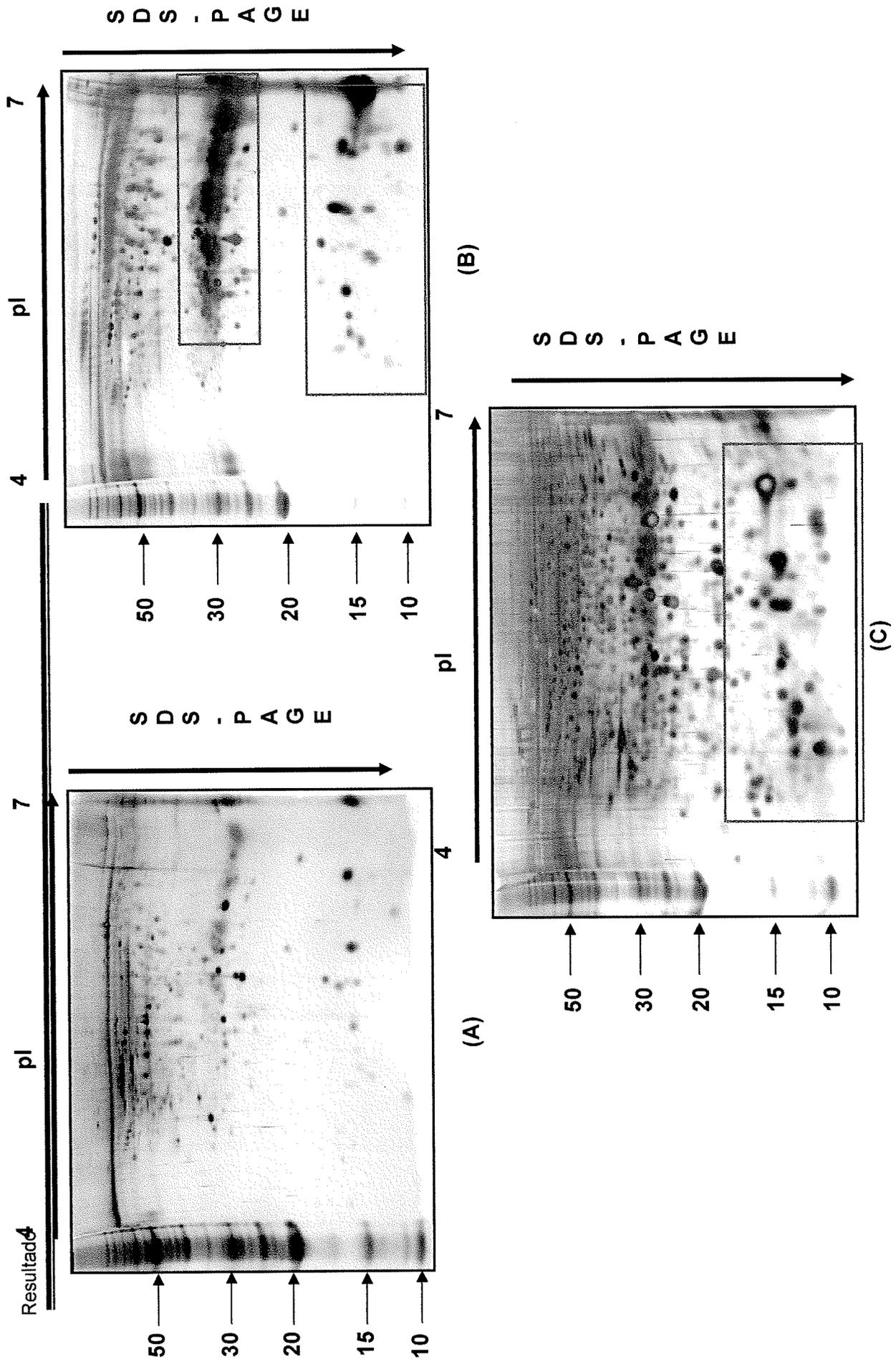


Figura 7. Electroforesis en gels de poliacrilamida de proteínas extraídas de (A) tejido normal , (B) tejido con NIC 3 y tejido cc

(C) CaCu invasor. Se observaron diferencias representativas en los rangos de pH 5 - 7 y pesos moleculares de 10 a 20 kDa:

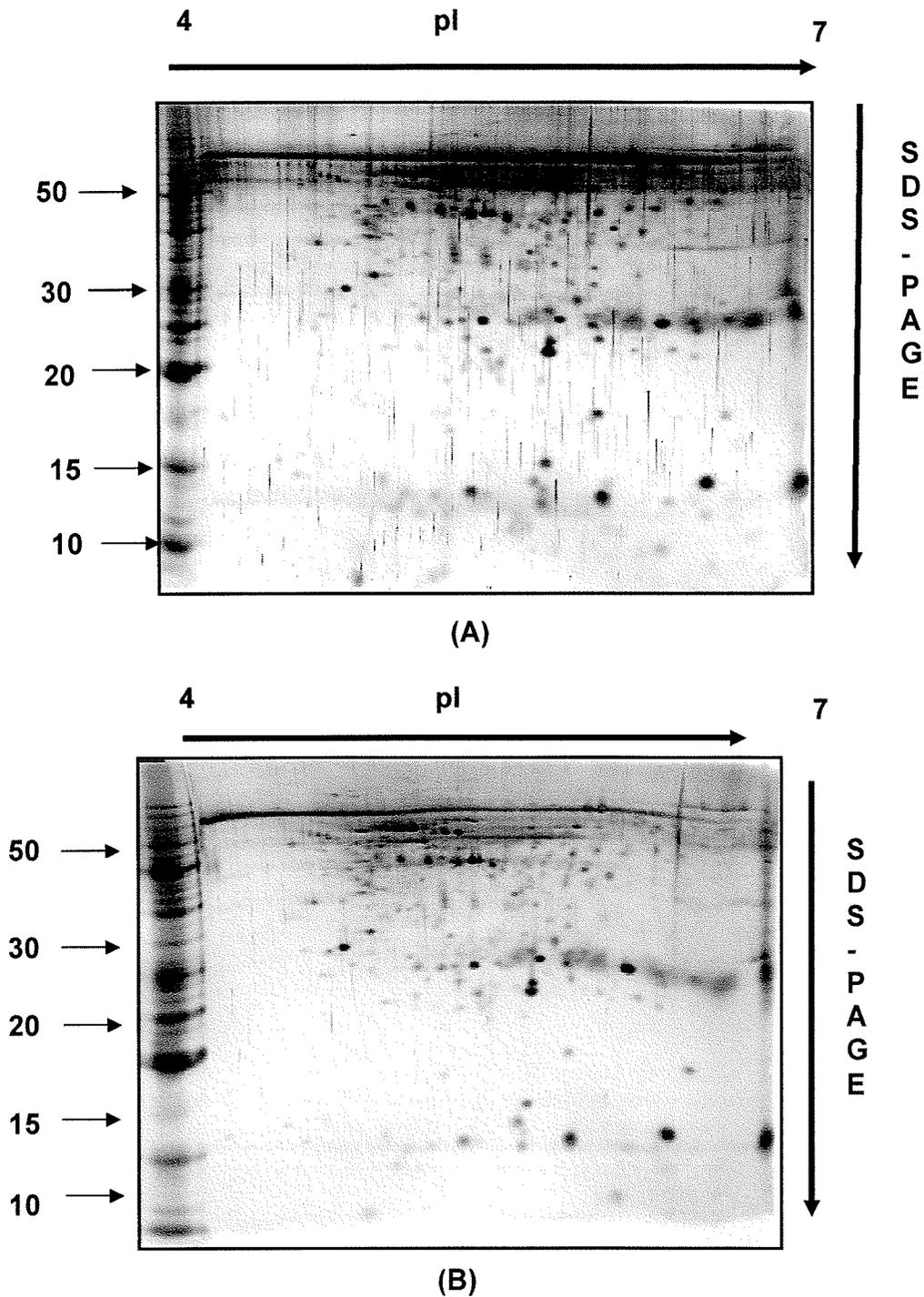


Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida de (A) tejido normal Día 1, (B) Día 3. Para la primera dimensión se utilizaron tiras de 7 cm pH 4 – 7, para la segunda se usaron geles de poliacrilamida al 15%. Tinción con plata.

4.4 ANALISIS DE LOS GELES

El análisis de los geles se realizó mediante el software PDQuest. Se determinó un promedio de 315 manchas para las muestras de tejido normal, 390 manchas en las muestras de NIC 3 y 530 manchas para las muestras de CaCU invasor.

Para poder realizar una comparación entre tejidos sanos y tejidos con alguna displasia las muestras se agruparon junto con sus réplicas en tres grupos: A, B y C correspondientes a muestras normales, muestras con NIC 3 y muestras con CaCU respectivamente (PDQuest manual Bio Rad).

Las muestras normales fueron utilizadas como control para determinar cantidad de manchas y la intensidad de cada una de ellas. En el caso de la intensidad, el software utiliza al control como referencia y le da un valor (1) y para el caso de las muestras problema se determinaron los siguientes parámetros: Si la intensidad es mas del doble (2 o mas) la mancha es detectada como un aumento en su contenido; si la intensidad está a la mitad o menos (0.5 o menos) la mancha es detectada como una disminución en su contenido. En la Figura 9 se muestra una mancha que presenta un cambio en su intensidad por lo que el software la detecta como aumento en su contenido.

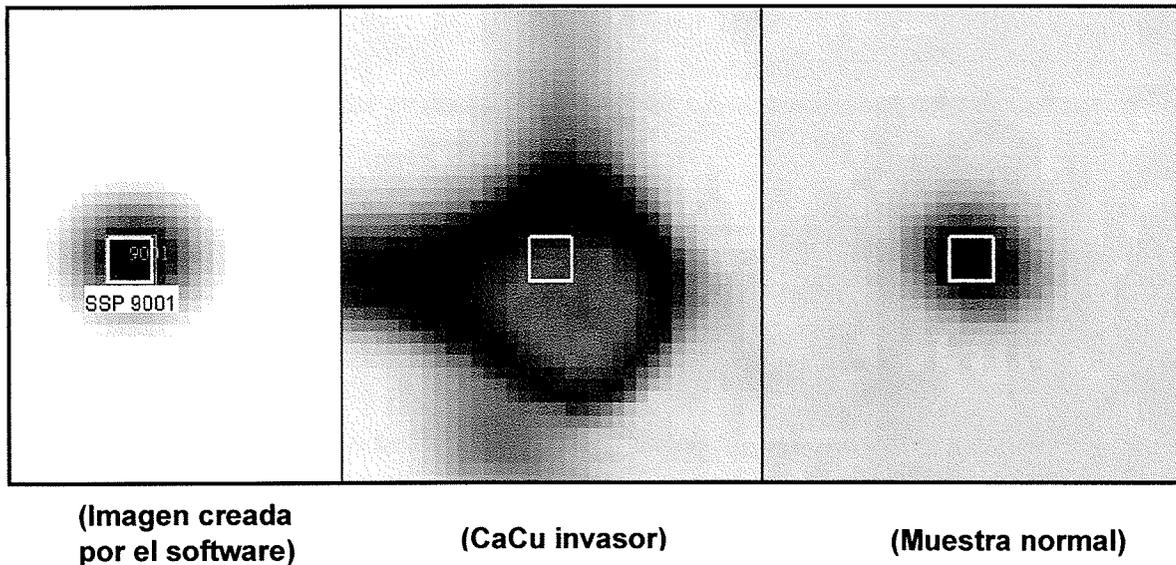


Figura 9. Análisis de una mancha la cual presenta un cambio en su intensidad.

Una vez determinados los parámetros se realizaron dos comparaciones:

1. El grupo de muestras control vs. el grupo de muestras con NIC3
2. El grupo de muestras control vs. el grupo de muestras con CaCU invasor.

En el análisis de la primera comparación se encontraron 110 manchas iguales, de 100 que estaban fuera de los límites 69 tenían una disminución en su contenido y 31 que presentaban un aumento en la Figura 10 se señalan algunas de las proteínas que tienen un aumento en su contenido. Las proteínas que se encuentran en un rango de pH 5.5 – 7 y un peso molecular de 10 a 30 kDa, estos son los rangos en los encontramos las diferencias más significativas.

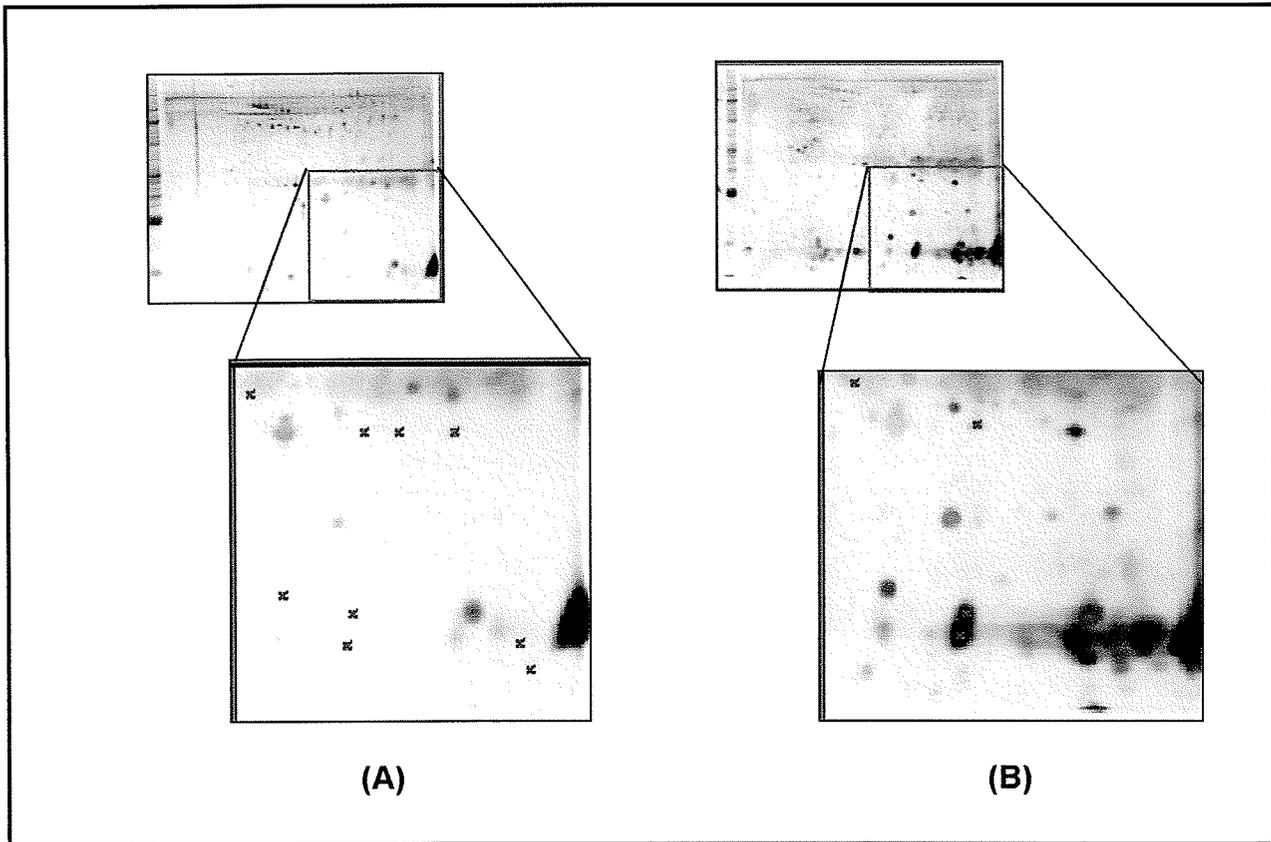


Figura 10. Análisis de los geles bidimensionales utilizando el software PDQuest. (A) Muestra de tejido normal, (B) muestra NIC3. Las cruces azules indican las manchas que tienen un aumento en su contenido.

En el análisis de la segunda comparación se encontraron 52 manchas iguales, de 46 que estaban fuera de los límites de las cuales 31 tenían un disminución y 15 un aumento en su contenido. En la Figura 11 se señalan algunas de las proteínas que tienen un aumento o disminución en su contenido, al igual que en el caso del análisis de las proteínas de las muestras de NIC 3. Diferencias significativas se encuentran en el mismo rango. En la Tabla 10 se muestra el peso molecular y el

punto isoelectrico de las manchas que se encuentran en el rango más representativo.

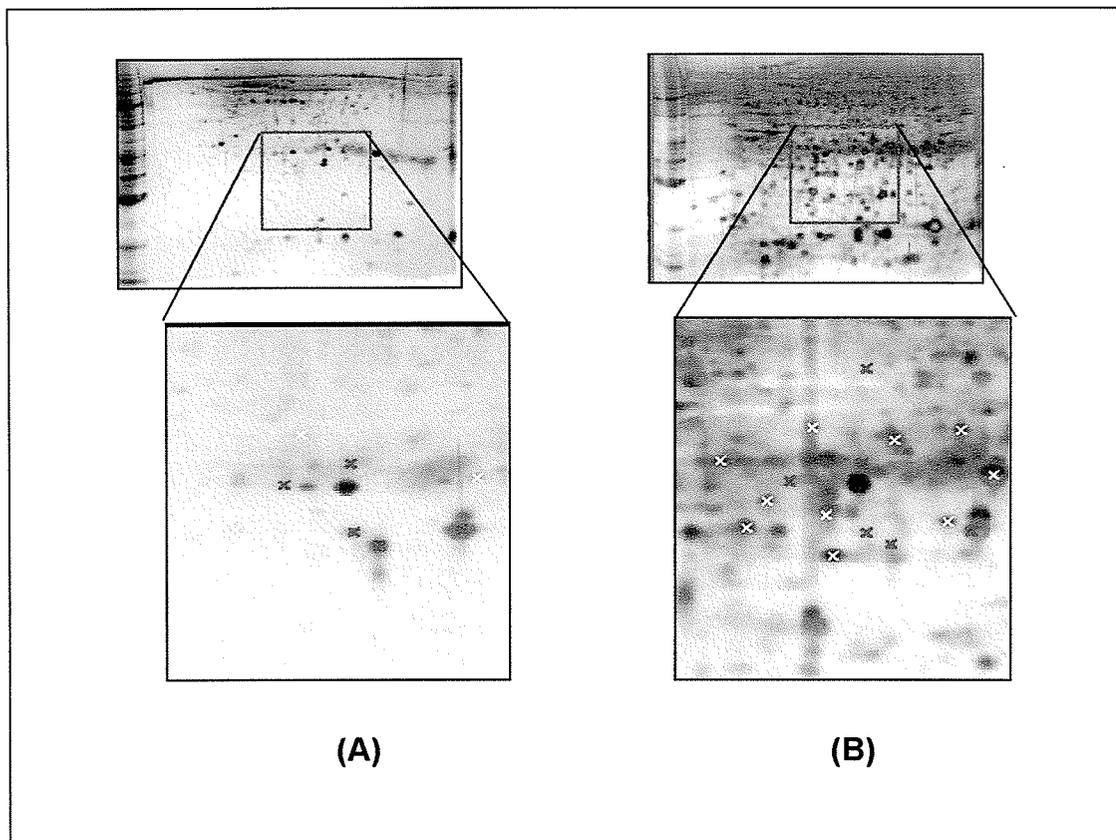


Figura 11. Análisis de los geles bidimensionales utilizando el software PDQuest. (A) Muestra de tejido normal, (B) muestra con CaCU invasor. Las cruces amarillas indican las manchas que tienen un aumento y las rojas indican las que tienen una disminución en su contenido.

Tabla 10. Lista de pesos moleculares y puntos isoelectricos de las manchas más representativas de CaCU invasor

PM	pl	PM	pl
32.22	5.82	37.99	5.38
39.12	5.91	15	5.25
35.69	6.17	11.5	5.3
36.07	6.23	14.48	5.39
14.57	5.9	21	5.64
17.16	6.08	27.88	5.67
26.71	6.29	27.1	5.46
28.82	5.92	29.71	5.48
28.55	5.97	33.63	5.62
33.11	6.07	33.96	5.51
32.13	6.23	31	5.54
35.13	5.9	41.24	5.61
37.97	5.98	35.89	5.48
39.42	6.1	43.19	5.66
27.9	5.91	45.59	5.69
28.98	6.45	15.3	5.7
34.16	6.56	19.43	5.74
32.6	6.4	26.05	5.89
35.36	6.73	28.68	5.89
35.88	6.4	30.21	5.69
38.25	6.59	29.47	5.72

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASAS

Las manchas de interés fueron cortadas manualmente y posteriormente desteñidas. Se enviaron al CINVESTAV – Irapuato para su análisis por espectrometría de masas MALDI – TOF. La identificación de proteínas se realizó por medio del software Mascot.

Los primeros resultados obtenidos, son provenientes de una mancha con peso molecular aproximado de 27 kDa y un pl de 6.5 (Figura 13, círculo 2). La muestra

se obtuvo de una paciente de 41 años de edad con una lesión NIC 3, los resultados obtenidos de la base de datos Mascot sobre el análisis de esta proteína se muestran en la Figura 14.

En la Tabla 11 se muestran los datos obtenidos del software Mascot. Se puede observar la posición inicial y terminal de cada péptido identificado, su peso molecular, los errores generados y la secuencia del péptido.

Tabla 11. Datos obtenidos por medio del software Mascot.

Inicio -Termino	PM observado	Errores	Secuencia
1 - 18	1883.97	0	-.EIVLTQSPGTLSSLSPGER.A
33 - 46	1693.84	1	R.RVAWYQHKPGQAPR.L
109 - 127	2102.11	1	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
110 - 127	1946.00	0	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
128 - 143	1797.86	0	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E

Para corroborar la información generada por la base de datos Mascot, se realizó un análisis en BLAST (www.ncbi.com) y se observa homología con la cadena ligera Kappa de la región variable de la Inmunoglobulina G. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 48425065 pdb 1NOX M Chain M, Crystal Structure Of A Broadl...	<u>367</u>	2e-100
gi 21669349 dbj BACO1699.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>327</u>	1e-88
gi 46015517 pdb 1RHH C Chain C, Crystal Structure Of The Broa...	<u>325</u>	4e-88
gi 21669471 dbj BACO1760.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>325</u>	6e-88
gi 21669423 dbj BACO1736.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>325</u>	6e-88
gi 21669427 dbj BACO1738.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>325</u>	7e-88
gi 21669447 dbj BACO1748.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>324</u>	9e-88
gi 21669421 dbj BACO1735.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>324</u>	1e-87
gi 21669339 dbj BACO1694.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>324</u>	1e-87
gi 21669485 dbj BACO1767.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>323</u>	2e-87
gi 10835794 pdb 1QLR C Chain C, Crystal Structure Of The Fab ...	<u>322</u>	4e-87
gi 21669461 dbj BACO1755.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>322</u>	5e-87
gi 45015863 gb AAS54981.1 anti-HIV-1 gp120 inmunoglobulin X5 li	<u>322</u>	7e-87
gi 21669395 dbj BACO1722.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>321</u>	1e-86
gi 21619606 gb AAH32451.1 Unknown (protein for MGC:40426) [Homo	<u>320</u>	1e-86
gi 229528 prf 751423A protein Len,Bence-Jones	<u>320</u>	2e-86
gi 38541890 gb AAH62704.1 Unknown (protein for MGC:71990) [Homo	<u>320</u>	3e-86
gi 49258112 gb AAH73793.1 Unknown (protein for MGC:88813) [Homo	<u>319</u>	3e-86
gi 21669347 dbj BACO1698.1 inmunoglobulin kappa light chain VLJ	<u>319</u>	3e-86
gi 16741061 gb AAH16380.1 Unknown (protein for MGC:27376) [Homo	<u>319</u>	4e-86

Figura 12. Resultado del análisis realizado con BLAST para ver la homología con otras secuencias.

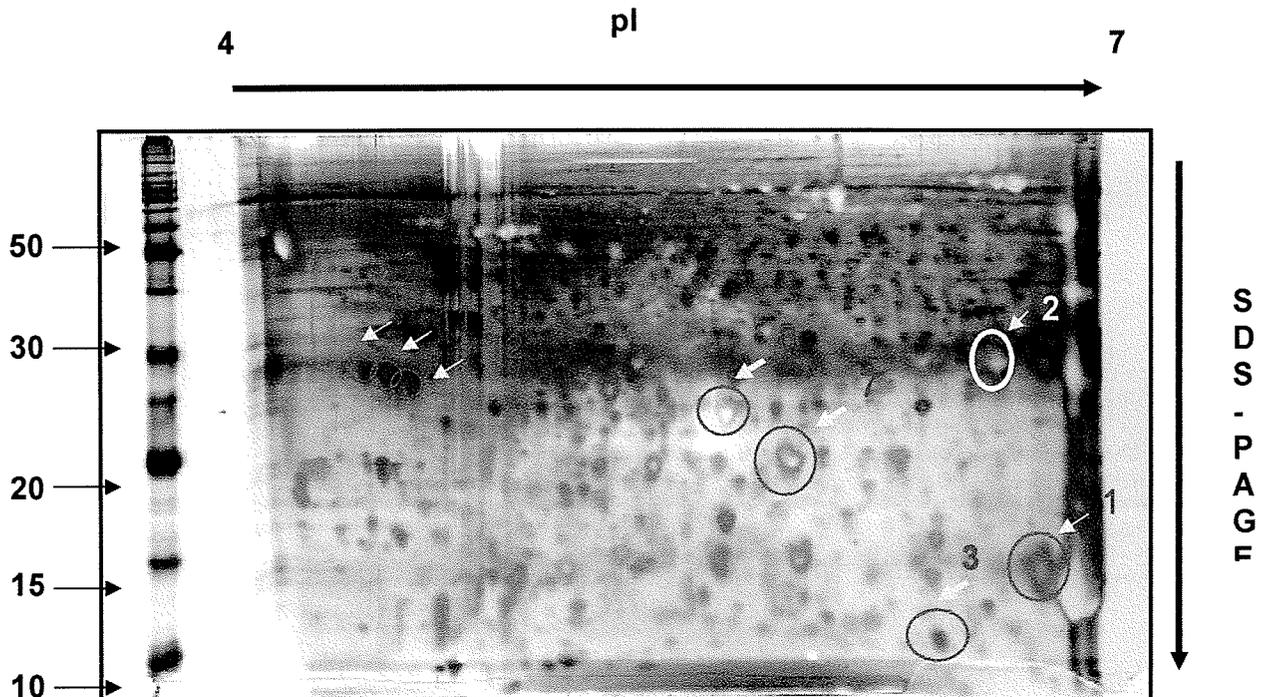


Figura 13. Escisión de manchas interés. Se utilizaron tiras de 11 cm pH 4 -7. Paciente de 41 años con una lesión NIC 3.

{MATRIX} {SCIENCE} Mascot Search Results

Protein View

Match to: **gi|48425065** Score: **80** Expect: **0.027**
Chain M, Crystal Structure Of A Broadly Neutralizing Anti-Hiv-1 Antibody In Complex With A Peptide Mimotope

Nominal mass (M_r): **23948**; Calculated pI value: **0.96**

NCBI BLAST search of [gi|48425065](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gi|48425063](#) from [Homo sapiens](#)

[gi|15825650](#) from [Homo sapiens](#)

[gi|15825649](#) from [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **8**

Number of mass values matched: **5**

Sequence Coverage: **31%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  EIVLTQSPGT LSLSPGERAT FSCRSSHSIR SRRWVYQHK PGGAPRLVIH
51  GVSNRASGIS DRFSGSGGT DFTLITRVE PEDFALYYCQ VYGASSYTFG
101  QGTKLERKRT VMAPSVFIFP PSEQLKSGT ASVWCLLNNF YBREAKVQWK
151  VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ
201  GLRSPVTKSF NRGEC
  
```

Figura 14. Resultado obtenido de la base de datos Mascot a partir de los datos generados por espectrometría de masas de una paciente con una lesión NIC 3. Las secuencias de péptidos idénticas aparecen en rojo.

V. DISCUSION

La preparación de la muestra es un punto crucial para la resolución de proteínas en electroforesis bidimensional. Muchos de los problemas que enfrenta este método son debidos a componentes celulares (lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.) que puedan afectar la migración de proteínas (Stasyk y col 2001). El método de TCA / Acetona modificado para la extracción de proteínas es el que proporcionó mejores resultados.

En un estudio realizado en biopsias de cáncer de mama reportan una cantidad de 30 μg para tiras de 7 cm obteniendo buenos resultados para tinción con plata (Bisca y col. 2004). Para este trabajo se utilizó una cantidad de 50 μg de proteínas totales por muestra en 2D-PAGE.

En comparación con algunos trabajos realizados con diferentes neoplasias (Bisca y col 2004; Brown y col 2002; Kellner y col. 2002), los cuales utilizan tiras de 7 cm pH 3 – 10 para la separación por punto isoelectrico, para este trabajo los mejores resultados en cuanto a la resolución de la muestra se obtuvieron utilizando tiras de pH 4 – 7 de 7 cm.

Hasta la fecha no se han reportado trabajos de proteómica en cáncer cervicouterino, sin embargo ha sido utilizada en el estudio de otras neoplasias como cáncer de mama, próstata y ovario. En el caso de cáncer de mama detectaron 150 manchas utilizando una concentración de 30 μg (Bisca y col

2004), en el caso de próstata detectaron alrededor de 450 manchas con una concentración de 100 μg en geles de poliacrilamida utilizando tiras con un rango de pH de 3 - 10. En este estudio los geles obtenidos se analizaron con la ayuda del software PDQuest (Bio – Rad). Se determinó un promedio de 315 manchas para las muestras de tejido normal, 390 manchas en las muestras de NIC 3 y 530 manchas para las muestras de CaCU invasor.

En el análisis comparativo de las muestras control vs. las muestras con NIC3 se detectaron 110 manchas iguales, de 100 que estaban fuera de los límites 69 tenían una disminución en su contenido y 31 que presentaban un aumento. En el caso de la comparación de las muestras control vs. CaCU invasor se detectaron 52 manchas iguales, de 46 que estaban fuera de los límites de las cuales 31 tenían una disminución y 15 un aumento en su contenido. Se pudo observar un cambio en el contenido de las proteínas y un mayor número de manchas en las muestras con diferentes grados de lesión.

Las manchas más representativas de cada lesión aún están siendo caracterizadas por espectrometría de masas. El primer resultado obtenido por espectrometría de masas fue obtenido de una mancha del patrón proteínico de una paciente con una lesión NIC3, con un peso molecular aproximado de 27 kDa y un pI de 6.5. Los datos obtenidos de la base de datos nos indican que probablemente corresponda a una cadena ligera (κ) de una Inmunoglobulina G. Todas las inmunoglobulinas tienen una estructura central común; dos cadena ligeras idénticas (cada una de aproximadamente 24 kDa) y dos cadenas pesadas idénticas (55 a 70 kDa) (Abbas y col. 1999).

VI. REFERENCIAS

- Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Pober S. Jordan Inmunología Celular y Molecular. Interamericana Mc Graw Hill 1999.
- Aebersold Ruedi, Anderson Leigh, Caprioli Richard, Druker Brian, Hartwell Leland, Smith Richard. Perspective: A Program to Improve Biomarker Discovery for Cancer. Journal of proteome research 2005
- Albanes D. Caloric intake, body weight and cáncer: a review. Nutr Cancer. 1987;9:199-217.
- *Barbara Seliger, Roland Kellner Designo f proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets Proteomics 2002, 2, 1641 – 1651*
- *Beutner, K. y col. Human papillomavirus and human disease. Am J Med 1997. 102 (5 A): 9-14.*
- Bisca Alessia, Ambrosio C., Scaloni Andrea, Puglisi Fabio, Aprile Giuseppe, Piga Andrea, Zuiani Chiara, Bazzocchi Máximo, Loreto Carla Di, Paron Igor, Tell Gianluca, Damante Giuseppe Proteomic evaluation of core biopsy specimens from breast lesions Cancer Letters 204 (2004) 79 – 86
- Bosch FX, Lorinez A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002;55:244-65.
- Bosch X, Comino R., Galera H., Guerra A., Hernández F., Nogueira JM., Rodríguez M, Vilata JJ. Monografía Diagnóstico de la Infección Genital por Virus Del Papiloma Humano (VPH) Madrid, 11 de noviembre de 2002
- Broso PR, Buffetti G. The Papanicolaou classification in the Bethesda System Minerva Ginecol. 1993 Nov;45(11):557-63.
- Brown M. Krutzsch H., Shu H., Zhao Y., Liotta L., Kohn E., Petricoin E. Proteomic análisis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer Proteomics 2002, 2, 77 - 84
- Castle PE, Lorincz AT Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, et al. Results of human papillomavirus DNA testing with hybrid capture 2 assay are reproducible. J Clin Microbiol 2002; 40:1088-90.
- *Chan S-Y, Ho L, Ong Ch-K, Chow V, Drescher B, Drüst M, ter Meulen J, Villa LL, Luande J, Mgaya H, Bernard H-U. 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. J Virol 66:2057-2066.*
- Cooper, K. y col. *Human papillomavirus, integration and cervical carcinogenesis: a clinicopathological perspective. J. Clin Pathol: Mol Pathol 1997; 50 (1): 1-3.*
- Cox JT, Lorincz A, Shiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:946-54.

- Cox JT. Evaluating the role of HPV testing for women with equivocal Papanicolaou test findings. JAMA 1999; 281:1645-7.
- Dexeus S, Cararach M, Dexeus D. The role of colposcopy in modern gynecology. Eur J Gynaecol Oncol 2002; 23:269- 77.
- Ferris DG, Greenberg MD. Red's colposcopic index. J Fam Prac 1994; 39: 65-70.
- Ferris DG. Officer procedures. Primary Care: Clin Office Prac 1997; 24: 241-67.
- Hadzic B, Hadzic M, Curcin N. Histologic classification and terminology of precancerous lesions of the cervix. Med Pregl 1999; 52: 151-5.
- Harrison, Fauci, Braunwald Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Lorigo. Principios de medicina Interna. Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, 14 Edición.
- Herrera Cristina y Campero Lourdes. La vulnerabilidad e invisibilidad de las mujeres ante el VIH/SIDA: constantes y cambios en el tema. Salud Pública 2002; 44:554-564.
- Ho BY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998;338:423-428.
- http://www.noble.org/Plantbio/MS/proto_tca.html
- Jenkins D. Diagnosing human papillomaviruses: recents advances. Curr Opin Infect Dis 2001; 14:53-62.
- Kellner R., Atkins D., Bukur J., Ackermann A., Beck J., Brenner W., Melchior S., Seliger B. Targeting of tumor associated antigeno in renal cell cancrinomma using proteome-bases análisis and their clinical significance Proteomics 2002 2, 1743-1751),
- Kennedy Sandy. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. ELSEVIER Toxicology letters. 2001; 120: 370-384
- Kiviat N. Natural history of cervical neoplasia: overview and update. Am J Obstet Gynecol 1996; 175:1099-104.
- Kurman, R. editor. Springer- Verlag, New York, 1994. Blaustein's Pathology of the female genital tract.
- Kurman, R. editor. Springer- Verlag, New York, 1994. Blaustein's Pathology of the female genital tract.
- La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función, Concha Gil García
- LaBaer. So, You Want to look for Biomarkers (Introduction to the Special Biomarkers Issue) Journal of proteome research 2005.
- Lacruz Pelea César. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001) Rev. Esp. Patol. 2003; 36: 5 - 10.
- Lorincz A. Diagnosis of human papillomavirus infection by new generation of molecular DNA assays. Clin Immunol News 1992; 12:123-8.
- McCance, J. *Human papillomavirus and cervical cancer*. J Med Microbiol 1998; 47: 371-3
- Meehan Katie L, Holland John W, and Dawkins Hugh J.S. Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer. The Prostate. 2002; 50: 54-63

- Meehen K., Holland J., Dawkins H. Proteomic Análisis of Normal and Malignant Prostate Tissue to identify Novel Proteins Lost in Cancer *The Prostate* 50:54 – 63 (2002).
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359(9312):1085–1092 (March 30, 2002).
- Muñoz N, Bosch FX, Shah KV and A. Meheus. The epidemiology of cervical Cancer and Human Papillomavirus. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 1992
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359(9312)1093–1101 (March 30, 2002).
- Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, J.J., Frizzell, M.A., Howley, P.M. & Sakai, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol* 74, 3752-3760.
- Obermair A, Handisurya A, Kaider A, Sevela P, Kdbl H, Gitsch G. The relationship of pre-treatment serum haemoglobin level to the survival of epithelial ovarian carcinoma patients. *Cancer* 1998;83:726-31.
- *Obstet Gynecol* 1998;91:848-50 by The American College of Obstetricians and Gynecologists.
- Olmos L. Condilomas Acuminados (verrugas genitales) II. *Enf. Trans Sex* 1990;4:131-42.
- Organización Panamericana de la salud Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en America latina y el caribe Lewis, Merle J. 2004.
- Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Fasoli M, Cecchetti G. Risk Factors for adenocarcinoma of the cervix: a case-control study. *Br J Cancer*. 1988;57:201-204.
- *Petricoin III Emanuel F, Ardekani Ali M, Hitt Ben A, Levine Peter J, Fusaro Vincent A, Steinberg Seth M, Mills Gordon B, Simone Charles, Fishman David A, Kohn Elise C y Liotta Lance A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. The Lancet* 2002;359:572-77.
- Phelps, W.C., Barnes, J.A & Lope D.C (1998). Molecular targets for human papillomaviruses: prospects for antiviral therapy. *Antivir Chem Chemother* 9, 359-377
- Ronco G. Use of molecular test of human papilloma virus (HPV) as screening test for cervix cancer: A review. *Epidemiol Prev* 1999; 23:372-7.
- Santos IS, Beral V. Socio-economic differences in reproductive behaviour. *IARC Scientific Publications* 138:285–308 (1997).
- Sarto, C. Deon, G. Doro, D.F. Hochstrasser, P. Mocarelli, J.C. Sanchez, Contribution of proteomics to the molecular análisis of renal cell carcinoma with an emphasis on manganese superoxide dismutase, *Proteomics* 1 (2001) 1288-1294
- Sedorf, k., Krämmmer, G., Dürst, M., Suhai, S & Röwekamp. W.G. (1985) Human Papilloma virus type 16 DNA sequence. *Virology* 145,181-185

- Shaphire Ollmann Erica, Parren I. H., Pantophlet Ralph, Zwick Michael, Morris Garrett, Rudd Pauline, Dwek Raymond, Stanfield Robyn, Burton Dennis, Wilson Ian. Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design *Science* 2001; 293: 1155 – 1159.
- Srivastava Sudhir y Srivastava Rashmi – Gopal. Proteomics in the Forefront of Cancer Biomarker Discovery *Journal of proteome research* 2005.
- Stasyt T., Hellman U., Souchelnytskyi S. Optimizing simple preparation for 2-D electrophoresis 2001 Amersham
- Suarez E., Rojas I., Olfos P., Prado R., Prieto M., Fernández M., Guía Clínica Cáncer Cervicouterino Chile esta mejor reforma de la salud 2005.
- Tan, S.-H., Leong, L. E. E., Wilker, P. A. & Bernard, H.-U (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol* 68,6411-6420.
- Terai Masanori y Burk Robert D. 2000. Complete nucleotide sequence and Analysis of a Novel Human Papillomavirus (VPH 84) Genome cloned by an Overlapping PCR Method. *Virology* 2001; 279:109-115.
- Tesarova P, Kvasnicka J. Erythropoietin therapy in Cancer patients. *Cas Leuk Ces* 1995;20:647-50.
- Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J.. Validation and development of fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology, *Proteomics* 1 (2001) 377-396
- Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J.. Validation and development of fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology, *Proteomics* 1 (2001) 377-396).
- *Torrades Sandra Proteómica El diseño molecular de la vida ámbito Farmacéutico Genética Volumen 23 Núm 4 Abril 2004).*
- Ursin G, Pike MC, Preston-Martin S, d' Ablain G, Peter RK, Sexual, reproductive and other risk factors for adenocarcinomas of the cervix: results from a population-based case-control study (California, United State). *Cancer Causes Control.* 1996;7:391-401.
- Ushikai, M., Lace, M. J., Yamakawa, Y. & 9 other authors (1994). Trans activation by the full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 *in vitro and in vivo*: cooperation with activation domains of cellular transcription factors. *J Virol* 68, 6655-6666.
- *Vázquez Cobos J. Presente y Futuro de la Proteómica Laboratorio de Proteómica, Universidad autonoma de Madrid 200.*
- Vitzthum Frank, Behrens Fritz, Anderson Leigh, Shaw John. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. A review of Requierements & Needs. *Journal of proteome research* 2005
- Walboomers JM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189:12–19 (1999)
- Zhou Ge, Li Hongmei, DeCamps Dianne, Chen She, Shu Hongjun, Gong yi, Flaig Michael, Gillespie John W, Hu Nan, Taylor Philip R, Emmert-

Buck Michael R, Liotta Lance A, Petricoin III Emanuel F y Zhao Yingming. 2D Differential in-el Electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Molecular & Cellular proteomics* 1.2. 2002;1:117-124.

- Zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections. A major cause de human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-F78.
- Zur Hausen, H. 1999. Papillomaviruses in human Cancers. *PROC. Assoc. American Physicians*. 111:581-587
- Zwerschke, W. & jansen-Dürr, P. (2000). Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res* 78, 1-29.

VII. APÉNDICE

A. Stock Solución de rehidratación IPG Buffer (8 M Urea, CHAPS al 4%, Azul de bromofenol al 0.02 %)

	Concentración final	Cantidad
Urea (PM 60.06)	8 M	12 g
CHAPS	2 % (w/v)	0.5 g
Azul de bromofenol	2 %	50 µl
H ₂ O bi-destilada		a 25 ml

*DTT e IPG Buffer o| Pharmalyte son añadidos justo antes de su uso:

Adicionar 7 mg de DTT por 2.5 ml de solución de rehidratación.
IPG Buffer al 0.5 % (12.5 µl por 2.5 ml)

B. Stock de Azul de bromofenol

	Concentración final	Cantidad
Azul de bromofenol	1 %	100 mg
Tris – base	50 mM	60 mg
H ₂ O bi-destilada		10 ml

C. Buffer de equilibrio SDS

	Concentración final	Cantidad
Tris-HCl, pH 8.8	50 Mm	
Urea (PM 60.06)	6 M	10 ml
Glicerol (87% w/v)	30% (v/v)	72.07 g
SDS (PM 288.38)	2 % (w/v)	69 ml
Azul de bromofenol	0.002 % (w/v)	400 µl de la solución al 1%
H ₂ O bi-destilada		200 ml

* Se añade DTT justo antes de utilizar la solución. 0.1 g de DTT por cada 10 ml.

D. SDS al 10%

	Concentración final	Cantidad
SDS (PM 288.38)	10 % (w/v)	5.0 g
H ₂ O bi-destilada		a 50 ml

E. Persulfato de amonio al 10%

	Concentración final	Cantidad
Persulfato de amonio (PM 288.20)	10 % (w/v)	0.1 g
H ₂ O bi-destilada		a 1 ml

F. SDS electroforesis buffer

	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	25 mM	30.3 g
Glicina (PM 75.07)	192 mM	144.0 g
SDS (PM 288.38)	0.1% (w/v)	10.0 g
H ₂ O bi-destilada		a 200 ml

G. Agarosa al 5%

	Concentración final	Cantidad
SDS electroforesis buffer		100 ml
Agarosa	0.5%	0.5 g
Azul de bromofenol	0.002%	200 µl

H. Buffer de corrida

	Cantidad
Tris	6g
Glicina	28.8 g
SDS	1 g

I. Soluciones para la tinción con plata

Solución	Componentes	1 Gel (ml)	2 Gel (ml)	3 Gel (ml)	4 Gel (ml)
Solución de fijado	Agua ultra pura	90	180	270	360
	Metanol	100	200	300	400
	Ácido Acetico	20	40	60	80
Solución de sensibilizado	Agua ultra pura	105	210	315	420
	Metanol	100	200	300	400
	Sensibilizador	5	10	15	20
Solución de teñido	Colorante A	5	10	15	20
	Colorante B	5	10	15	20
	Agua ultra pura	90	180	270	360
Solución de desarrollo	Agua ultra pura	95	190	285	380
	Desarrollo	5	10	15	20
Solución de paro	Solución de paro	5	10	15	20