



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

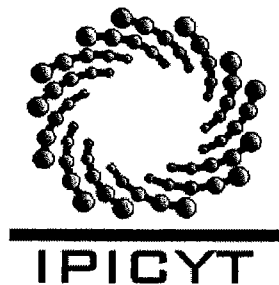
**Análisis proteómico de sueros en pacientes con
cáncer cérvico-uterino**

Tesis que presenta
Ofelia Yadira Lugo Melchor

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 010 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 16:00 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.

Ofelia Yadira Lugo Melchor

sobre la Tesis intitulada:

Análisis proteómico de sueros en 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

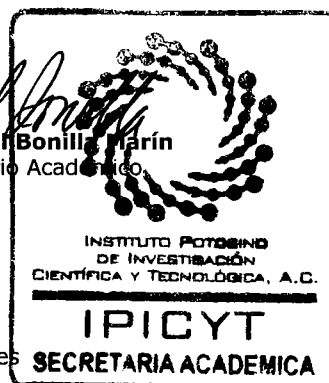
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:45 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 de agosto de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

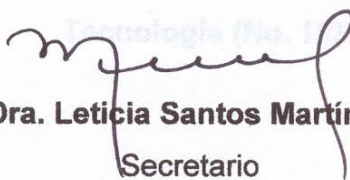

Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



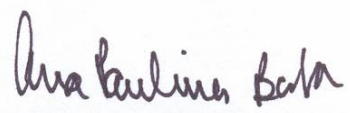
La presente tesis de Maestría en Ciencias en la especialidad de Biología Molecular fue elaborada por Ofelia Yadira Lugo Melchor y aprobada el 1 de agosto de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



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 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 la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 182158).

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mis padres y a mi hermano por su apoyo brindado a pesar de la distancia y por darme fuerza para seguir adelante. A mis amigos porque siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, muchas gracias por no dejarme sola

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Paulina Barba de La Rosa por todo su apoyo y por sus enseñanzas.

Al Dr. Rubén López Revilla y a la Dra. Leticia Santos Martínez por su asesoría para la realización de la tesis.

Al Dr. Julio Ortiz de la Clínica de Displasia de la Secretaría de Salud, al Dr. Julio Castelo del Hospital Central "Enrique Morones Prieto" y a la Médico Pasante de Servicio Social Sara Fonseca Castañol porque nos proporcionaron las muestras que se utilizaron para la realización de la investigación.

Al Dr. Mauricio Salcedo del IMSS Siglo XXI por donar los anticuerpos que se utilizaron para la realización de los Western blot.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez por su asesoría en la utilización del software PDQuest.

Al MC Raymundo Méndez de Acceso Lab por su asesoría técnica.

A mis compañeros del laboratorio 2: Sara, Erika, Ana, Cecilia, Midory y Lulú por su apoyo.

Al IPICYT por su apoyo para continuar con mis estudios.

Al CONACYT, FOMIX-GTO Y FOMIX-SLP por su apoyo económico.

INDICE GENERAL

	Página
Índice general	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
Resumen Abstract	
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Cáncer cervicouterino	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Virus del Papiloma Humano	3
1.4 Métodos de diagnóstico	7
1.5 Proteómica	9
1.6 Herramientas de la proteómica	10
1.7 Proteómica y cáncer	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Obtención de la muestra	14
2.2 Preparación de la muestra	14
2.2.1 Eliminación de albúmina e IgG	14
2.2.2 Extracción de proteínas	15
2.3 Cuantificación de proteínas	15
2.4 Electroforesis bidimensional	15
2.4.1 Primera dimensión – Isoelectroenfoque	15
2.4.2 Segunda dimensión – SDS-PAGE	16
2.5 Tinción	17

2.6 Análisis de geles	17
2.7 Espectrometría de masas	17
III. RESULTADOS	
3.1 Procesamiento de las muestras	19
3.2 Separación de proteínas bidimensional (2D-PAGE)	20
3.3 Análisis de geles usando el software PDQuest	29
3.4 Western Blot	33
IV. DISCUSIÓN	36
V. REFERENCIAS	40
ANEXO 1	45
ANEXO 2	47
ANEXO 3	48
ANEXO 4	49
ANEXO 5	50
ANEXO 6	52

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pagina
1	Sistemas de clasificación del CaCU	7
2	Resumen de pl y PM (KDa) de las proteínas de cada una de las regiones identificadas	31
3	Intensidad de cada una de las manchas por región	32
4	Resumen de las características de los grupos y número de proteínas presentes por región	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Modelo tridimensional del virus del papiloma humano	3
2	Modelo del genoma del virus del papiloma humano	4
3	Patrón electroforético de sueros.	20
4	2D-PAGE de suero normal. Regiones con un patrón de proteínas constante	21
5	2D-PAGE de suero positivo para VPH	22
6	2D-PAGE del suero NIC 1	23
7	2D-PAGE para suero NIC 3	24
8	2D-PAGE de suero CaCU invasor	25
9	Variaciones en el contenido de proteínas de la región A	26
10	2D-PAGE de la región B de suero normal y NIC3	27
11	2D-PAGE de la región C de sueros control y problemas	28
12	Proteínas que componen región E	29
13	Gel Master originado del análisis con el software PDQuest. Se comparan dos geles de CaCU invasor (A), (B) para crear el Master (C)	30
14	Western blot usando anti-p53, anti-HOXB2, anti-MMP1 y anti-IL-1 en sueros 1) normal, 2) positivo para VPH y 3) NIC 3	34

RESUMEN

El Cáncer Cérvicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial y constituye un grave problema de salud pública en países en vías de desarrollo como México. El análisis se realizó con el fin de poder conocer las proteínas presentes en sueros sanos como en las diferentes neoplasias y cáncer invasor para poder identificar marcadores específicos que podremos utilizar como métodos de diagnóstico temprano y poder entender la progresión de este tipo de cáncer. Se utilizaron sueros de pacientes sanos como control negativo y sueros de pacientes con las diferentes neoplasias. La electroforesis bidimensional se llevo a cabo en tiras con un rango de pH 3 -10 en geles de poliacrilamida en gradiente y al 15 %, su detección fue a través de tinción de plata y Sypro Ruby y por ultimo el análisis se llevo a cabo por medio del software PDQuest. Las manchas diferenciales fueron enviadas para su caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF). En este trabajo, se utilizó a la proteómica para identificar proteínas en CaCU. Se encontraron diversos grupos de proteínas y algunas de ellas muestran cambios en sueros de pacientes en etapas tempranas comparadas con los normales. Estas proteínas podrán ser utilizadas como biomarcadores séricos para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, Proteómica, suero, espectrometría de masas, biomarcador.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second cause of death by neoplasia in women worldwide and is a public health problem in developing countries, including México. The proteomic analysis was performed with aim to know the expression of proteins in health serum, different neoplasia stages and invasive cancer to identify specific biomarkers that use as early diagnostic methods and know the progression of this type of cancer. Serum of healthy patients were used as negative controls and serum of patients at different neoplasia stages. Immobiline DryStrips with pH range 3-10 were used for two dimensional electrophoresis in gradient gel and 15% of polyacrilamide, the detection of proteins by silver staining and Sypro Ruby and finally for the analysis of gels was used the software PDQuest. The results show different clusters of proteins in the different phases of CC and show that an early phase does not contain proteins as in normal serum. The different spots found were sent to analyze by mass spectrometry (MALDI-TOF). In this study, we used proteomics to detect serum proteins in CC. We found different groups of proteins during the progression from early to terminal phases of the disease. These proteins could be useful as serum biomarkers for early disease diagnostic.

Key words: Cervical cancer, Proteomics, serum, mass spectrometry, biomarker.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCU) constituye un problema importante de salud pública y es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial, después del cáncer de mama (Dzul y col., 2004; Parkin y col., 1993). Aproximadamente el 80% de los 500 mil casos que se calculan en el mundo corresponde a los países en vías de desarrollo. Se ha notificado que las tasas de incidencia más elevadas se presentan en países africanos, latinoamericanos y en algunos asiáticos (Pisani y col., 1990).

El CaCU es la segunda causa de muerte entre las mexicanas y su incidencia y mortalidad es de alrededor de 15 500 casos nuevos y 4 500 muertes por año (Alonso y col., 2001).

El CaCU es un cambio en las células que cubren las paredes del cuello uterino (la parte inferior de la matriz que va del útero a la vagina, o el canal de parto). Estas células son inicialmente normales y gradualmente se convierten en precancerosas, se manifiestan como lesiones en la pared del útero. Eventualmente pueden cambiar a células cancerosas, sin embargo en más del 50% de las mujeres con lesiones pre-cancerosas, las células permanecen benignas (pre-cancerosas) (<http://www.path.org>). Es una enfermedad con un período de latencia prolongado y avanza en forma silenciosa durante varios años,

periodo durante el cual puede ser diagnosticado a través de la prueba de Papanicolaou (Pap); si esta intervención no se realiza es posible que la neoplasia cervical haya alcanzado tal dimensión que lo más probable es que ya se encuentre en proceso de expansión (Benítez y col., 1990).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Datos epidemiológicos han demostrado que el factor de mayor riesgo para el desarrollo de CaCU es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) que es transmitido por vía sexual. Se han reportado que existen cofactores para el desarrollo de esta enfermedad como son: la edad de la mujer, la edad de inicio de relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales de la mujer o de su pareja sexual y además de la predisposición genética, el tabaquismo, el uso de prolongado de anticonceptivos orales, algunas enfermedades de transmisión sexual (e.g. herpes), la deficiencia de folatos y vitaminas A, C y E, inmunodeficiencia congénita o adquirida y nunca haberse realizado el estudio citológico (Suris y col., 1999; Lazcano y col., 1993; Brinton y col., 1986; Herrero y col., 1990).

1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Actualmente el VPH es el factor etiológico central que está implicado en 99.7% de los casos de CaCU y de sus lesiones precursoras (Walboomers y col., 1999).

Los papilomavirus son miembros de la familia *Papillomaviridae* (Baker y col., 1991). Son virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) sin cubierta de 55 nm de diámetro con una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (Figura 1).

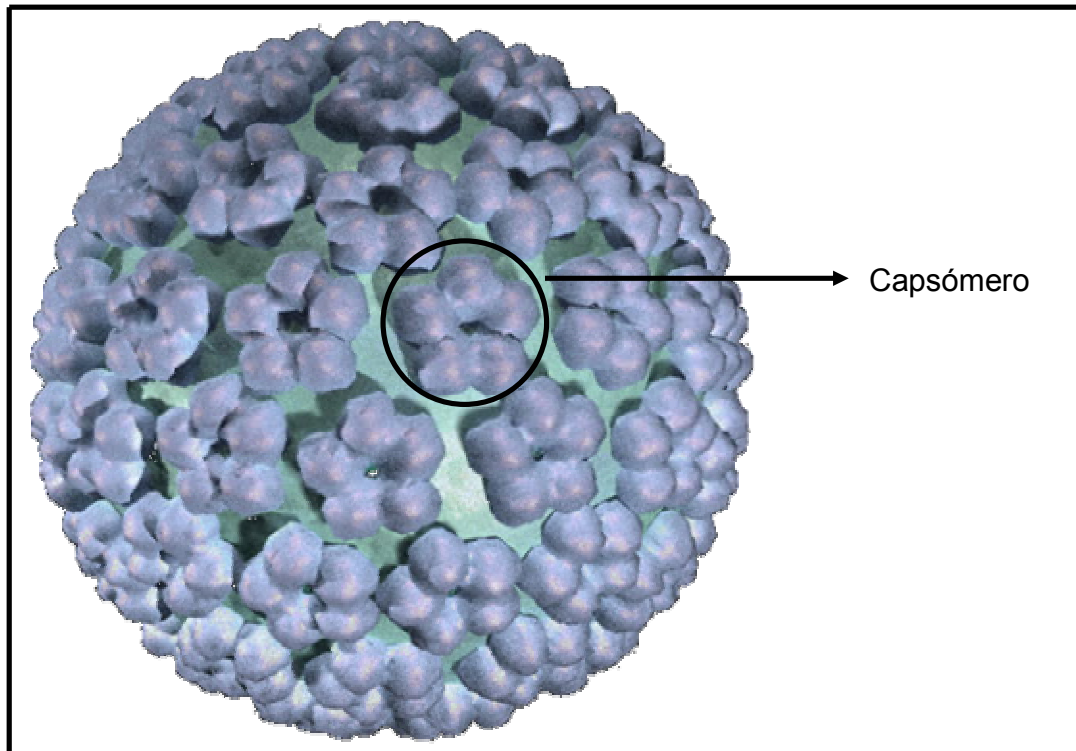


Figura 1. Modelo tridimensional del Virus del Papiloma humano.

El genoma del VPH es un ADN circular de doble cadena que contiene aproximadamente 7900 pb. (Palefsky y col., 1995). El genoma está dividido en tres regiones (Figura 2):

- 1) Región no codificante de 400 a 1000 pb, Región Larga de Control (Long Control Region, LCR) que es responsable de regular la replicación del DNA y controlar la transcripción de los marcos de lectura (Open Reading Frames, ORF).

- 2) Región temprana que contiene los ORFs de E1, E2, E4, E5, E6 y E7, involucrados en la replicación viral y la oncogénesis.
- 3) Región tardía que codifica a L1 y L2 proteínas estructurales de la cápside viral (Burd, 2003).

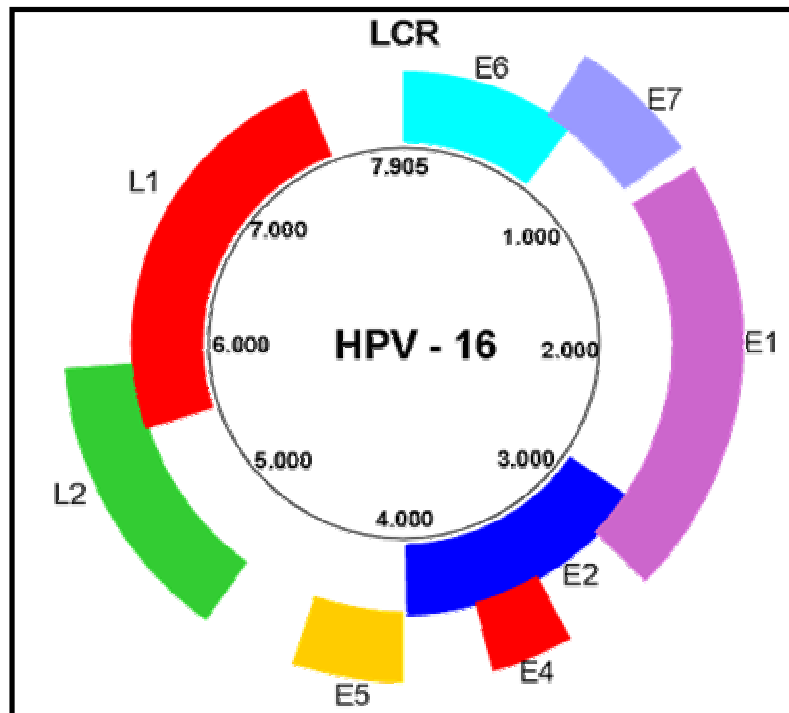


Figura 2. Modelo del genoma del virus del papiloma humano.

El ADN viral puede estar integrado al ADN celular en CaCU y en líneas celulares derivadas de CaCU; algunos reportes indican que el ADN de VPH puede también existir en estado episomal (extracromosomal). El ADN de VPH se encuentra en estado episomal en lesiones premalignas (De Villiers, 1989).

La integración del genoma viral implica una interrupción en el gen E2 del VPH, lo que conduce a una alteración de los mecanismos regulatorios de la replicación viral. En las células transformadas o tumores se expresan los

oncogenes virales E6 y E7. El mecanismo por el cual estos genes virales participan en la oncogénesis está relacionado con la propiedad que tienen sus proteínas de formar complejos e inactivar varias proteínas celulares. La proteína del gen E7 es capaz de unirse a la proteína del retinoblastoma (Rb), y el gen E6 se une a la proteína p53. Tanto Rb como p53 corresponden a proteínas supresoras de tumor, cuya función normal es controlar la proliferación celular y cuya pérdida está relacionada con el desarrollo de tumores. Es así que la expresión de los genes E6 y E7 en las células del cuello uterino tiene un efecto similar a las mutaciones en los genes supresores p53 y Rb. Esto se correlaciona bastante bien con la baja frecuencia de mutaciones en estos genes en los tumores de cuello uterino que contienen genomas del VPH (Ojeda y col., 1992).

Actualmente, mas de 100 diferentes tipos de VPH han sido identificados y alrededor de 40 de estos pueden causar alguna enfermedad genital (Muñoz y col., 2003). Los VPH pueden infectar las células basales del epitelio de la piel o la cubierta interna del tejido y se caracterizan como de tipo cutáneos o mucoso (Burd, 2003). En base a su asociación con el CaCU y lesiones precursoras, los VPH se clasifican como tipos de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), riesgo moderado (tipos 26, 53 y 66) y los de bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81) (Muñoz y col., 2003).

El cuello uterino esta tapizado por dos tipos de epitelio, el epitelio cilíndrico, que reviste al conducto endocervical y que es mucosecretor, y epitelio escamoso, que cubre la superficie del exocervix. El sitio de unión de estos dos epitelios se

denomina zona de unión escamocolumnar. Debido a que en esta área hay cambios muy activos, se le denomina zona de transformación, y es asiento de numerosos fenómenos proliferativos y de remodelación. El cambio del epitelio cilíndrico en epitelio plano se denomina metaplasia. (Alonso y col., 2001).

La historia natural de CaCU se ha dilucidado por completo (Alonso y col., 2001); se inicia con una neoplasia intraepitelial cervical leve (NIC1), pasa por las de alto grado (NIC2), posteriormente llega a cáncer in situ (NIC3) y finalmente a cáncer invasor (Holowaty y col., 1999). Esta historia natural tiene un tiempo de evolución en términos generales de entre 10 y 15 años, tiempo suficiente que tenemos para modificar esta historia natural en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado y con ello evitar un cáncer invasor y la muerte de las mujeres con este padecimiento (Bocanegra, 2003). Las alteraciones del epitelio metaplásico anormal han sido motivo de numerosas clasificaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de clasificación del CaCU.

Displasia Años 49-69	¿HPV?	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia grave	Carcinoma <i>in situ</i> (CIS)
NIC (Richart) Años 69-89	HPV	NIC 1	NIC 2	NIC 3	
Sistema Bethesda desde 1989	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG)		Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG)		

Lacruz, 2003

1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los principales métodos de diagnóstico para detectar esta enfermedad son la citología e histología. Recientemente, se han introducido los métodos moleculares para detectar la presencia de ADN del VPH en muestras clínicas (Burd, 2003). El Pap es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de esta enfermedad utilizado hasta la fecha en el cual se observan los cambios celulares de la zona de transformación del cérvix (unión escamocolumnar). Este procedimiento tiene algunas limitaciones como por ejemplo se han reportado falsos negativos en un 20 a 30%, estos resultados pueden deberse a que no se dispersan las células en todo el portaobjetos, que la muestra esté contaminada con sangre, presencia de bacterias o levaduras lo cual evita la detección de células anormales; si la muestra está expuesta mucho tiempo al aire una vez fijada al portaobjeto, el error humano, etc. (Burd, 2003).

Las pacientes con Pap anormales se evalúan por colposcopia, este método consiste en la aplicación de una solución de ácido acético al 3% o 5% para ayudar a discriminar el epitelio normal del anormal (Ferris, 1997; Dexeus y col., 2002). La colposcopia puede detectar displasias de bajo y alto grado. Este no es un método de diagnóstico definitivo ya que se verifica la presencia de una lesión, se determina su topografía, extensión y severidad, y permite tomar una biopsia dirigida. Sin embargo, el diagnóstico final y requisito indispensable para aplicar un

proceso terapéutico es el histopatológico de una biopsia de la lesión (Morris y col., 1996; Massad y col., 2003).

Debido a que el desarrollo de la biología molecular en las dos últimas décadas ha sido explosivo, se han implementado técnicas de gran utilidad para la investigación y el diagnóstico clínico (Wick, 2000). Los tres principales métodos utilizados para la detección del VPH son: 1) hibridación *in situ*, 2) captura de híbridos (Digene hc2) y 3) análisis basados en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Hubbard, 2003).

1.5 PROTEÓMICA

El término "Proteoma" se define como el conjunto proteínico entero expresado por un genoma, término acuñado en 1994 por Marck Wilkins (Wilkins y col., 1996; Poon y col., 2001).

Actualmente el genoma humano (The International Human Genome Mapping Consortium, 2001; The Celera Genomics sequencing Team, 2001) y muchos otros genomas han sido secuenciados. A diferencia del genoma que es estático, el proteoma de una célula o tejido es altamente dinámico y está cambiando constantemente con respecto al medio que lo rodea, estado fisiológico, estrés, administración de drogas, o en estado de salud o enfermedad (Wells y col., 2003).

El genoma humano contiene aproximadamente 30000 genes de los cuales se espera que se codifiquen 30000 proteínas diferentes, pero es difícil predecir el número actual de proteínas codificadas por el genoma, por varias razones como el splicing alternativo de un transcrito, las modificaciones post-traduccionales (e.g. fosforilación, acetilación, metilación y glicosilación), la compartimentalización y translocación (Lau y col., 2003)

La proteómica es uno de los campos que puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico, constituyendo una herramienta importante en el análisis funcional de genes de función desconocida (Aebersold, 2003).

1.7 HERRAMIENTAS DE LA PROTEOMICA

Una de las principales herramientas de la proteómica es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) (Anderson y col., 2000; Celis y col., 1998). Esta técnica 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 tecnología ha existido por tres décadas y esta basada en una separación de las proteínas en función de la carga, seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular. La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoco, durante el cual las proteínas se separan en un gradiente de pH hasta alcanzar una

posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico (pI). En una segunda dimensión, las proteínas se separan por su peso molecular (PM) mediante electroforesis. Posteriormente para la detección de las proteínas se utiliza la tinción con azul de Coomassie, con plata o tinciones más sensibles como SYPRO Ruby y Deep Purple (Gil, 2003).

La otra herramienta clave de la proteómica es la espectrometría de masas (Mass Spectrometry, MS), que lleva a cabo la identificación de las proteínas (Wittke y col., 2005). Para analizar las proteínas mediante MS deben ser convertidas a péptidos mediante proteólisis, generalmente con tripsina. Los péptidos generados se convierten en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización desorción láser asistida con matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI). Posteriormente los iones son separados de acuerdo a su relación masa-carga (M/Z) en un analizador de masas tipo ToF (Time of Flight). Los datos obtenidos son analizados mediante softwares disponible en la red como MASCOT en www.matrixscience.com, este software hace búsquedas en base de datos para determinar la secuencia de las proteínas (Aebersold, 2003; Lau, 2003).

1.8 PROTEÓMICA Y CÁNCER

La proteómica del cáncer es un campo que esta proporcionando nuevos desarrollos en los últimos años. La detección temprana es crítica en el control y prevención del cáncer (Ral y col., 2004). La proteómica se ha utilizado para el

estudio de diferentes tipos de cánceres por ejemplo de carcinoma hepatocelular, pulmón, colón, mama, próstata, ovario, esófago, riñón (Seow y col, 2000; Mckerrow y col., 2000; Hanash y col., 2001; Stasyk y col., 2001; Petricoin y col., 2002; Meehan y col., 2002; Zhou y col., 2002).

La proteómica del cáncer identifica y analiza cuantitativamente las proteínas presentes en tejidos sanos y las compara con las que están presentes en tejidos enfermos. La información obtenida puede ser utilizada para identificación de marcadores para el diagnóstico del cáncer, monitorear la progresión de la enfermedad, monitorear la respuesta al tratamiento y para identificar blancos terapéuticos (Srinivas y col., 2001).

Desde el punto de vista clínico, el término de marcador molecular es aplicado a todas las sustancias producidas y liberadas por las células tumorales o por la células del huésped y su presencia puede detectarse en el suero u otros líquidos corporales (Gadduci y col., 2003).

Actualmente, las investigaciones se han enfocado en el análisis proteómico de los sueros, líquido remanente que se obtiene después de la coagulación del plasma, esto debido a que en el suero se encuentra una gran cantidad de proteínas y cambios en la presencia de las proteínas pueden ser signos tempranos de alguna alteración fisiológica y puede ser indicativo de enfermedad (Ahmed y col., 2003). Un inconveniente de utilizar suero es la presencia de proteínas abundantes como albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina y alfa-

1-antitripsina que representan un 80% de las proteínas presentes en él. Por lo tanto se tienen que eliminar ya que causan interferencias y pueden enmascarar proteínas menos abundantes que son mas utilizadas como biomarcadores, debido a que muchas de ellas funcionan como “mensajeros” que informan a la células el encendido y apagado de vías de señalización importantes para la muerte celular o desarrollo de enfermedades (Morita, 2004; Anderson y col., 2002; Bailey, 2004).

La proteómica es utilizada para detectar proteínas producidas por células cancerosas que son secretadas al torrente sanguíneo y pueden ser detectadas mediante un análisis de sangre, lo cual es una gran ventaja debido a que el cáncer puede ser detectado sin tener que tomar una muestra de biopsia (Petricoin, 2002).

En este trabajo, utilizamos a la proteómica como una herramienta para la identificación de proteínas sérica que estén asociadas con los diferentes estadios de CaCU y que puedan servir como biomarcadores que permitan diagnosticar esta enfermedad en etapas tempranas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Los sueros fueron proporcionados por la Clínica de Displasias del Centro de Salud “Juan H. Sánchez” perteneciente a la Secretaría de Salud de San Luis Potosí, cuyo diagnóstico fue corroborado por histopatología. Se tomaron 6 ml de sangre total y fueron centrifugados a 3 000 rpm por 15 minutos en una centrifuga clínica, el suero resultante se alicuotó en fracciones de 1 ml y se congelaron a -80°C. Se utilizaron tres muestras negativas, tres muestras aparentemente positivas para VPH de acuerdo a citología, tres NIC 1, tres NIC 3 y tres con CaCU invasor. Los sueros control fueron proporcionados por el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de pacientes con un Papanicolaou normal. La recolección de la muestra se obtuvo con el consentimiento informado de la paciente y se realizó un interrogatorio de antecedentes ginecobstétricos y sociodemográficos.

2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

2.2.1 Eliminación de albúmina e IgG. Se utilizó el kit para remover albúmina e IgG (Amersham). Este kit utiliza una resina de afinidad para dichas proteínas asegurando que las proteínas menos abundantes permanezcan en la muestra (Amersham). Las instrucciones fueron seguidas según el manual del kit (Anexo 2).

2.2.2. Precipitación de proteínas. Para concentrar las proteínas una vez removida la albúmina e IgG, se siguió el protocolo para precipitación con acetona (Anexo 3).

2.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (BioRad), es un procedimiento para determinar la concentración de proteína solubilizada, que involucra la adición de un colorante ácido (Coomassie) a la solución proteínica, y subsecuentemente es medida a 595 nm con un espectrofotómetro. La comparación con una curva estándar provee un valor de la concentración de proteínas. El protocolo que se utilizó para realizar la curva de calibración y cuantificación de las muestras se muestran en el anexo 4.

2.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

2.4.1. Primera dimensión isoelectroenfoque

La primera dimensión consiste en la separación por punto isoeléctrico, se llevó a cabo en el equipo Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences) en tiras de 7 cm y 13 cm en un rango de pH de 3-10 (Immobiline DryStrip, Amersham). La concentración de proteínas que se utilizó fue de 120 µg. La rehidratación de la tira y la separación por isoelectroenfoque se llevo a cabo de acuerdo a las especificaciones del manual de Amersham Biosciences (Anexo 5). Una vez que la corrida es finalizada se procede a quitar los electrodos, las esponjas y por último la

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

3.4.2. Segunda dimensión – SDS-PAGE

Después de la separación por isoelectroenfoque se lleva a cabo la segunda dimensión que es la separación por peso molecular (PM) en geles desnaturizantes de poliacrilamida con gradiente de 10 - 20 % y en geles al 15 % de acuerdo al método de Laemli (1974). La segunda dimensión consiste de los siguientes pasos: preparación del gel de segunda dimensión, equilibrio de la tira, colocar la tira equilibrada en el gel SDS y corrimiento electroforético. Los geles de poliacrilamida en gradiente de 10 – 20 % se prepararon en el equipo Hoefer SG 15 formador de gradiente (Amersham), utilizando un concentrador de 4%. Se utilizaron vidrios con un grosor de 1.5 mm.

Si la tira no es congelada se incuba en una solución de equilibrio (Anexo 1, solución 1) por 15 min. y se agrega 0.1 gr DTT por cada 10 ml. Se elimina el exceso de solución con un papel filtro. Se coloca en el gel y se fija con agarosa 0.5 % (Anexo, solución 7). 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 (Anexo 1, solución 8)

2.5 TINCIÓN

Las tinciones se realizaron con plata con el kit SilverXpress Silver Staining (Invitrogen) y SYPRO Ruby (Molecular Probes) (Anexo 6).

2.6 ANÁLISIS DE GELES

Los geles fueron analizados y comparados con el programa PDQuest (BioRad), para obtener la cantidad de puntos que presenta cada gel y compararlos entre sí marcando las diferencias que existen entre ellos ya sean proteínas sobreexpresadas o reprimidas. También se obtiene la intensidad de cada uno de las manchas.

2.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las manchas diferenciales que se encontraron en los geles se cortaron, destiñeron y se colocaron en tubos eppendorf con agua MilliQ. Se enviaron al CINVESTAV unidad Irapuato, donde se realizó la digestión triptica y se están identificando las proteínas por MALDI-TOF. La información que se obtuvo de la digestión triptica se analizó mediante el programa MASCOT, que utiliza una base de datos para identificar las proteínas. Las proteínas y genes se identifican automáticamente comparando con la bases 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>).

III. RESULTADOS

3.1 Procesamiento de la muestra.

La preparación de la muestra es algo crucial para la obtención de un buen patrón de proteínas de suero. La abundancia de proteínas como: albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobulina y la alfa-1-antitripsina que comprenden un 80% de las proteínas en el suero humano, pueden causar interferencia en 2D-PAGE. Se probaron varios tipos de métodos de limpieza entre ellos esta la precipitación con acetona, limpieza con el kit 2D Clean Up (Amersham) y el kit para remover albúmina e IgG (Amersham). Después de la centrifugación de la sangre total para la obtención del suero, cada muestra se limpió con el kit 2D Clean Up y las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15%. En la Figura 3 se muestra el patrón electroforético de los sueros donde se puede observar una banda diferente con un PM de aproximadamente 15 KDa (circulo rojo), lo cual nos indica que hay un bajo contenido de esta proteína en la muestra NIC3 (carril 3) en comparación con las otras muestras.

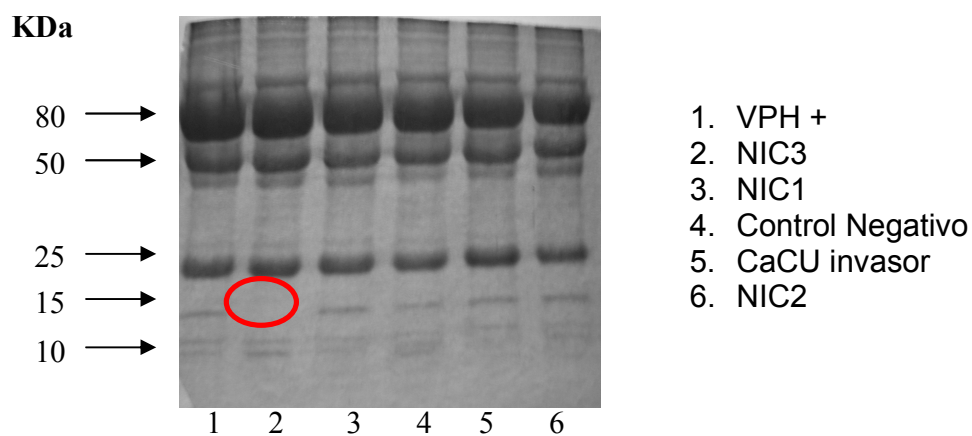


Figura 3. Patrón electroforético de sueros.

3.2 Separación de proteínas por electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

Para determinar las condiciones óptimas de la separación bidimensional, se realizaron varias corridas con geles a diferentes porcentajes de poliacrilamida por ejemplo, en gradientes 10-20% y al 15%, en gradiente de pH 3 – 10 y para su detección se utilizaron diversas tinciones como Azul de Coomassie, plata y tinciones mas sensibles como SYPRO Ruby. De estas condiciones se definió que los mejores resultados se obtuvieron en geles al 15% de poliacrilamida en gradiente de pH 3 – 10 teñidos con plata, debido a que se obtuvo una mejor separación.

Se analizaron los distintos patrones bidimensionales para cada tipo de muestra (Suero normal, positivo para VPH, NIC 1, NIC 3 y CaCU invasor), se observan 4 regiones que se mantienen constantes para todas las muestras, sólo

difieren en el contenido de las manchas de las que están compuestos y los denominados como grupo A, B, C y E (Figura 4, 5, 6, 7 y 8).

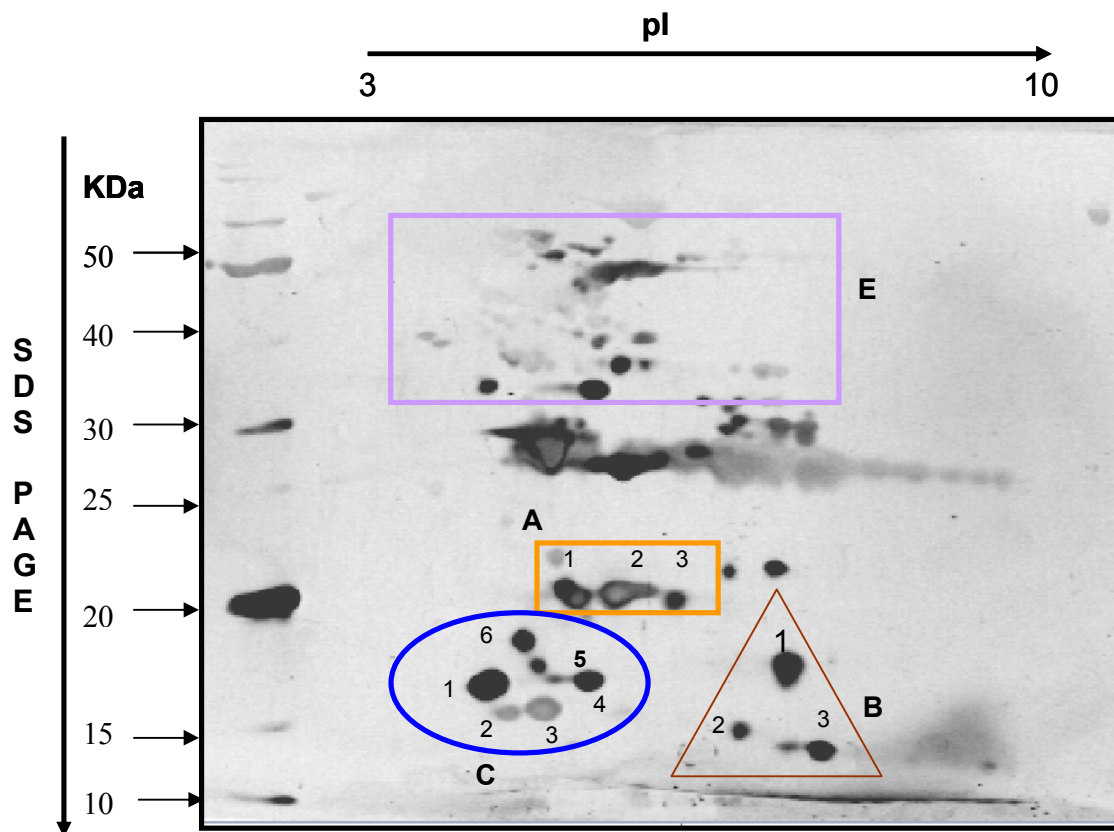


Figura 4. 2D-PAGE de suero normal. Regiones con un patrón de proteínas constante

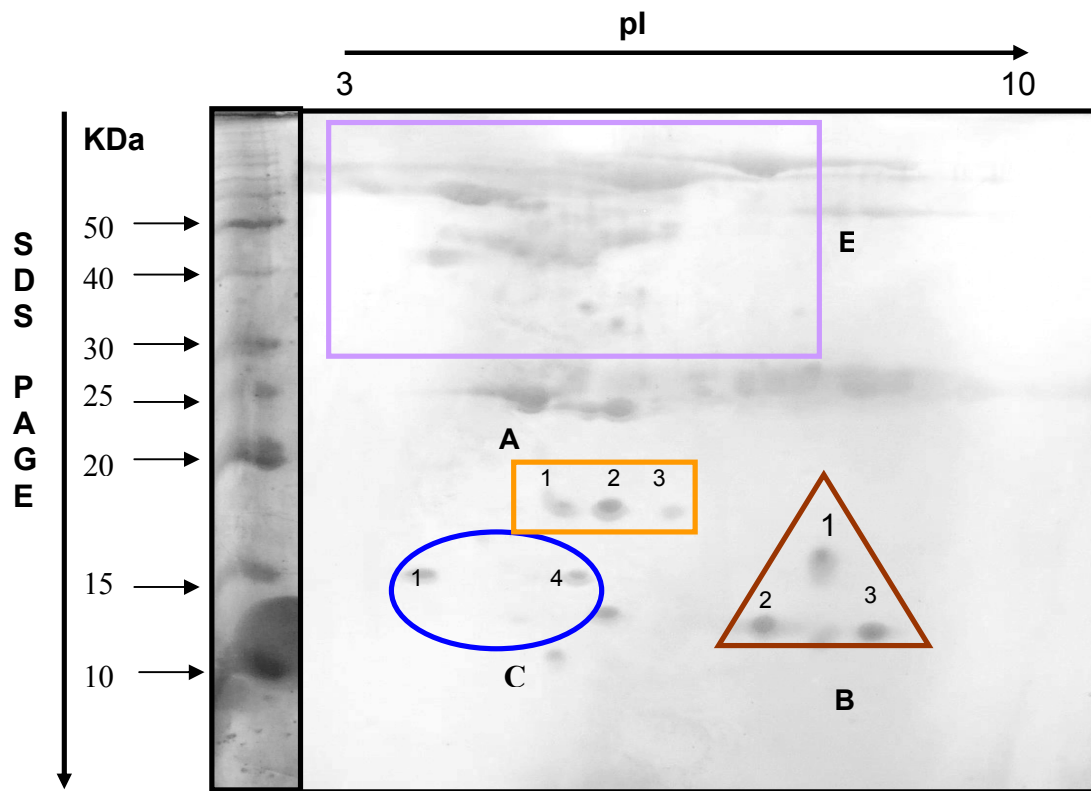


Fig. 5. 2D-PAGE de suero positivo para VPH.

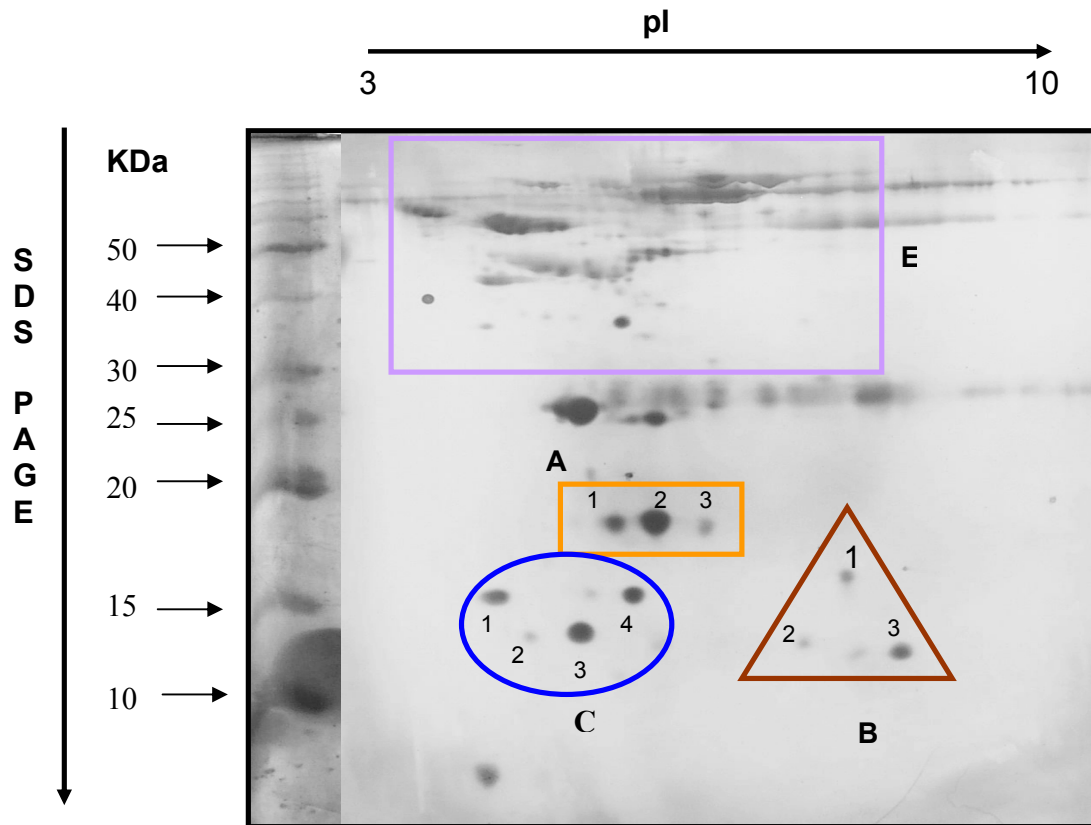


Figura 6. 2D-PAGE del suero NIC 1.

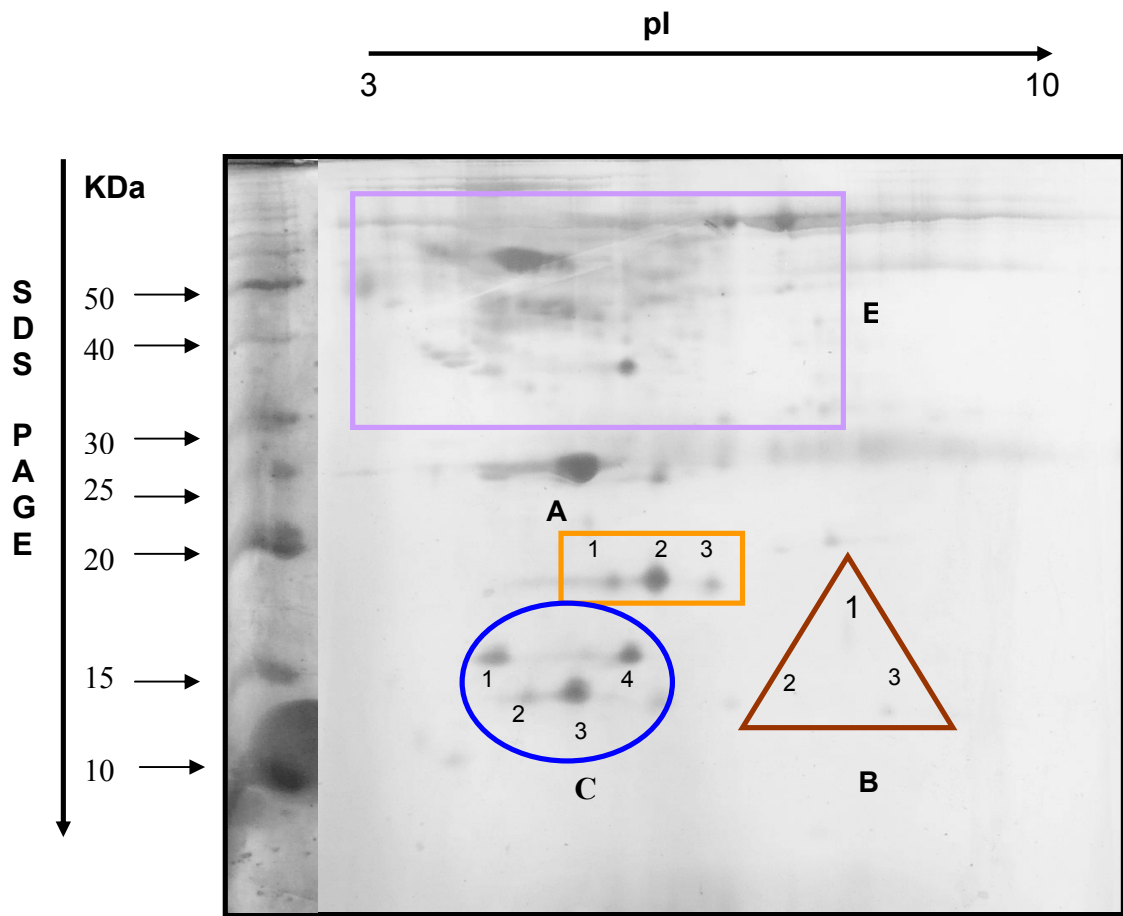


Fig. 7. 2D-PAGE para suero NIC 3

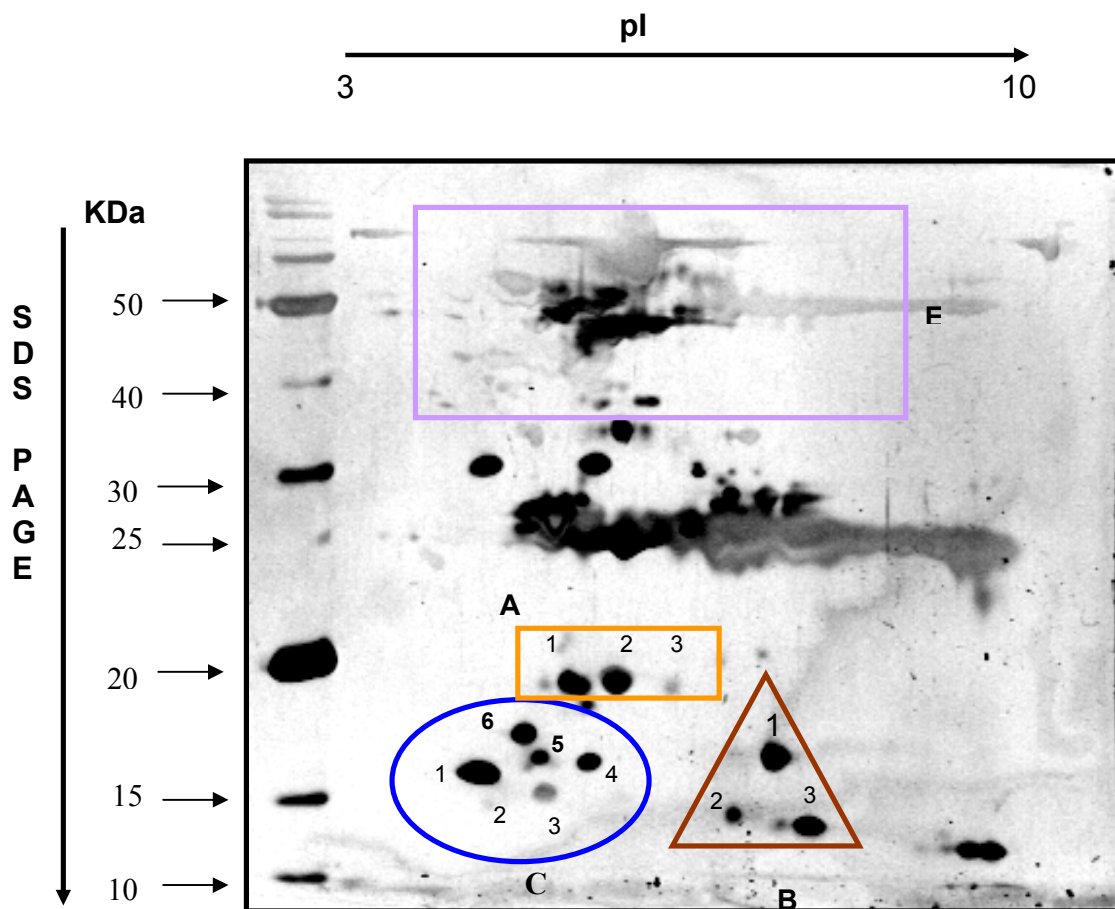


Figura 8. 2D-PAGE de suero CaCU invasor.

La región A con un patrón bidimensional normal (Figura 9 A) ésta compuesto por 3 manchas. Sólo existe en NIC 3 (Figura 9 B) la mancha 1 y 3, esta última va disminuyendo su concentración pero el cambio es más notorio en el CaCU Invasor (Figura 9 C) donde su contenido es menor que en las otras muestras.

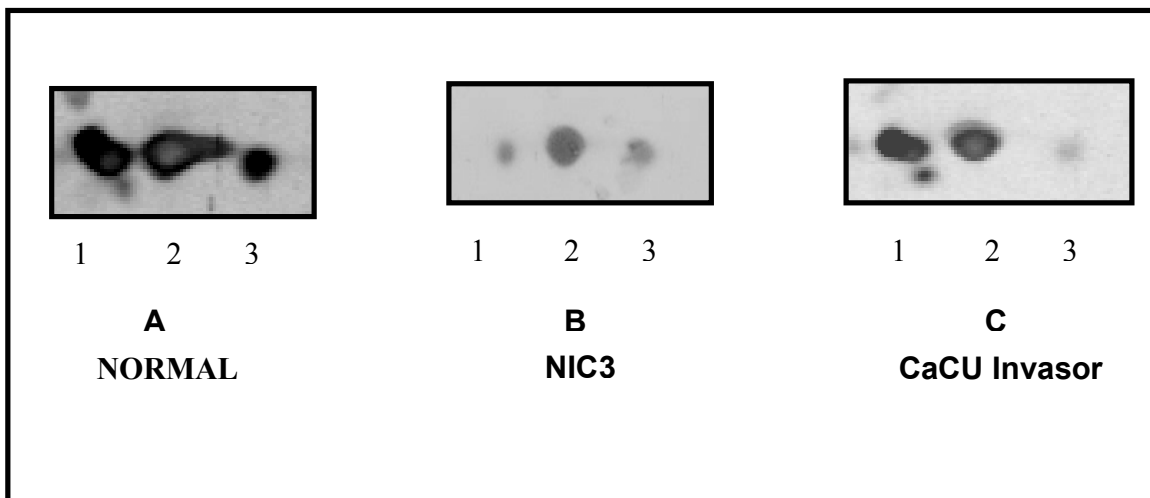


Figura 9. Variaciones en el contenido de proteínas de la región A.

El región B (Figura 10 A) está compuesto por 3 manchas se encuentran también en casi todas las muestras a excepción del NIC 3 (Figura 10 B), donde su presencia es mas baja en comparación con los otros patrones. Este grupo se encuentra localizado en un rango de PM de 14-17 con un pl 7-8.

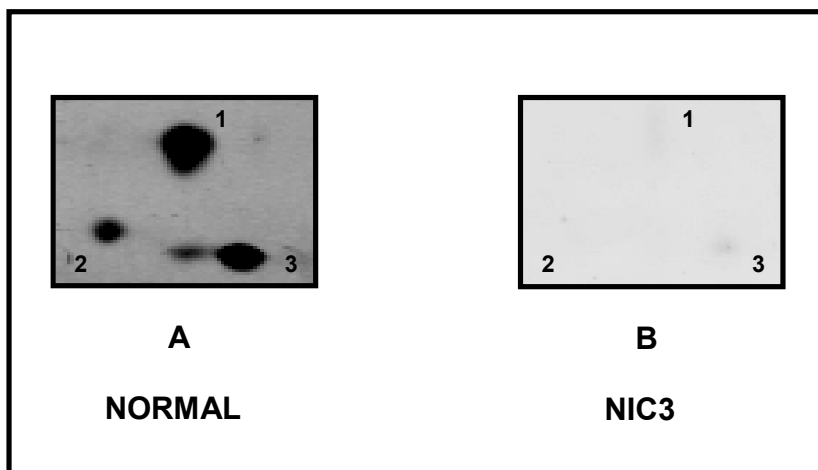


Figura 10. 2D-PAGE de la región B de suero normal y NIC3

La región C (Figura 11) está compuesto por 6 manchas en su patrón bidimensional normal (Figura 11 A) y es el más variado al compararlo con el resto de las muestras. En el patrón bidimensional de suero positivo para VPH (Figura 11 B) podemos observar que solo las manchas 1, 4 y 5 están presentes mientras que las manchas 2, 3 y 6 su intensidad es menor o casi nula en comparación con el normal. En el patrón de NIC 1 (Figura 11 C) y NIC 3 (Figura 11 D) la presencia de este grupo se empieza a restablecer a excepción de las manchas 5 y 6. La intensidad de la mancha 2 disminuye o es casi nula en el CaCU invasor (Figura 11 E).

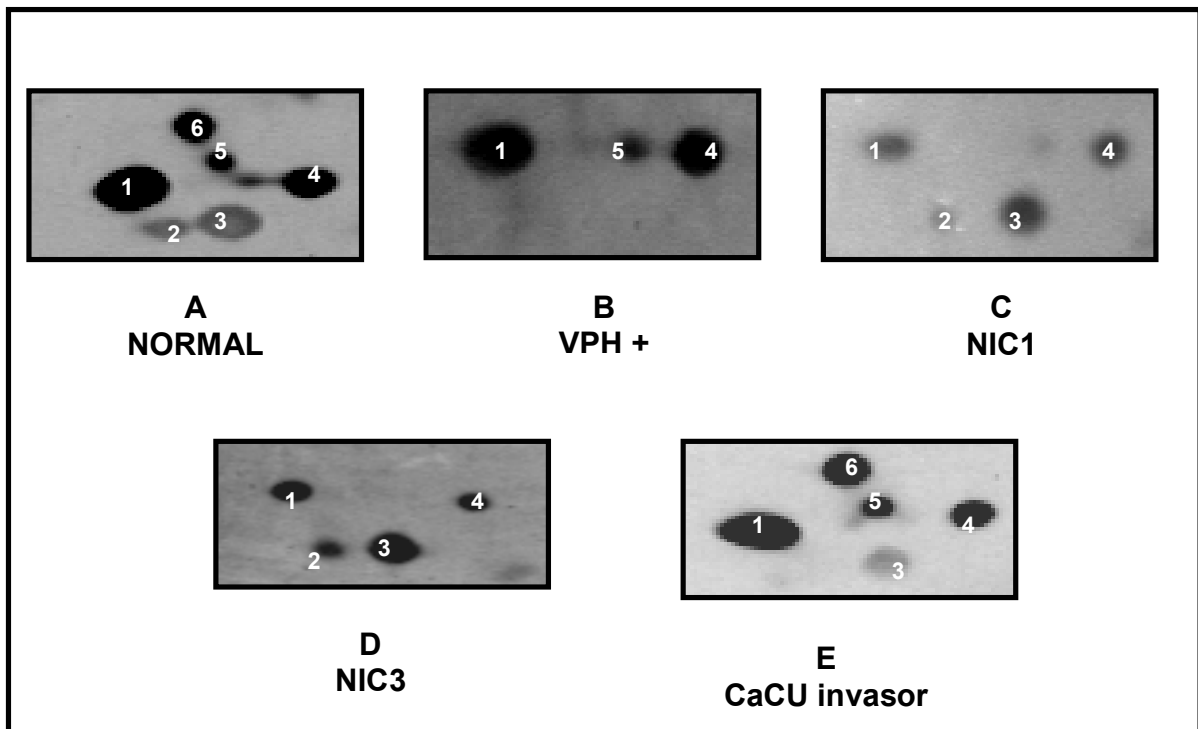


Figura 11. 2D-PAGE de la región C de sueros control y problemas.

En la Figura 12 se muestra un gel con un gradiente 10-20% y muestra a la región E compuesto principalmente por las proteínas más abundantes que se encuentran en el suero (en un 80 % que son Albúmina, α 1-Antitripsina, Transferrina, Ig) (Lau, 2003).

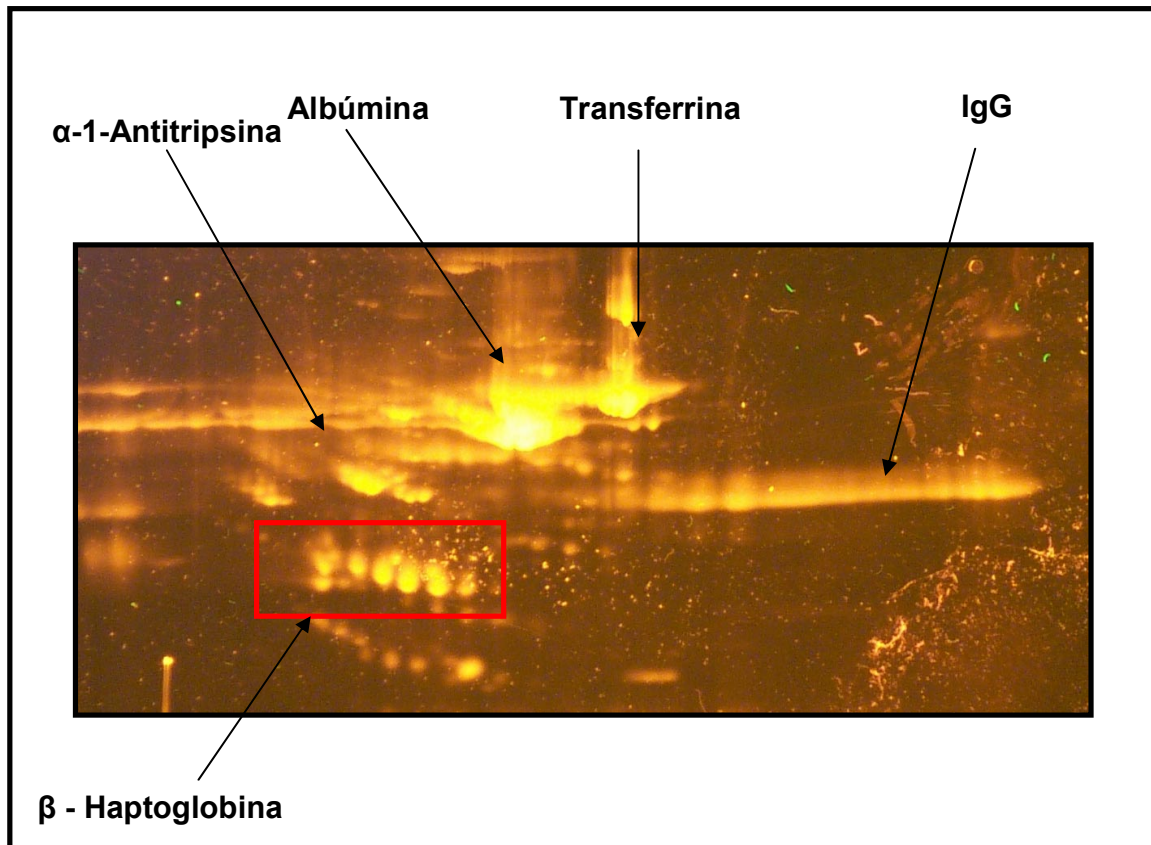


Figura 12. Proteínas que componen la región E.

3.3 Análisis de geles usando el software PDQuest

Los patrones bidimensionales de los sueros fueron analizados mediante el programa PDQuest (BioRad) en las diferentes fases de la enfermedad de CaCU. El software da información del número de manchas que se obtienen por muestra y marca las diferencias entre las proteínas presentes.

Con este programa se crea un master o un gel patrón de las muestras que se corrieron, como se ve en la Figura 13, nos compara dos sueros diferentes con CaCU invasor y muestra las diferencias lo cual se puede llegar a la conclusión que la técnica es reproducible.

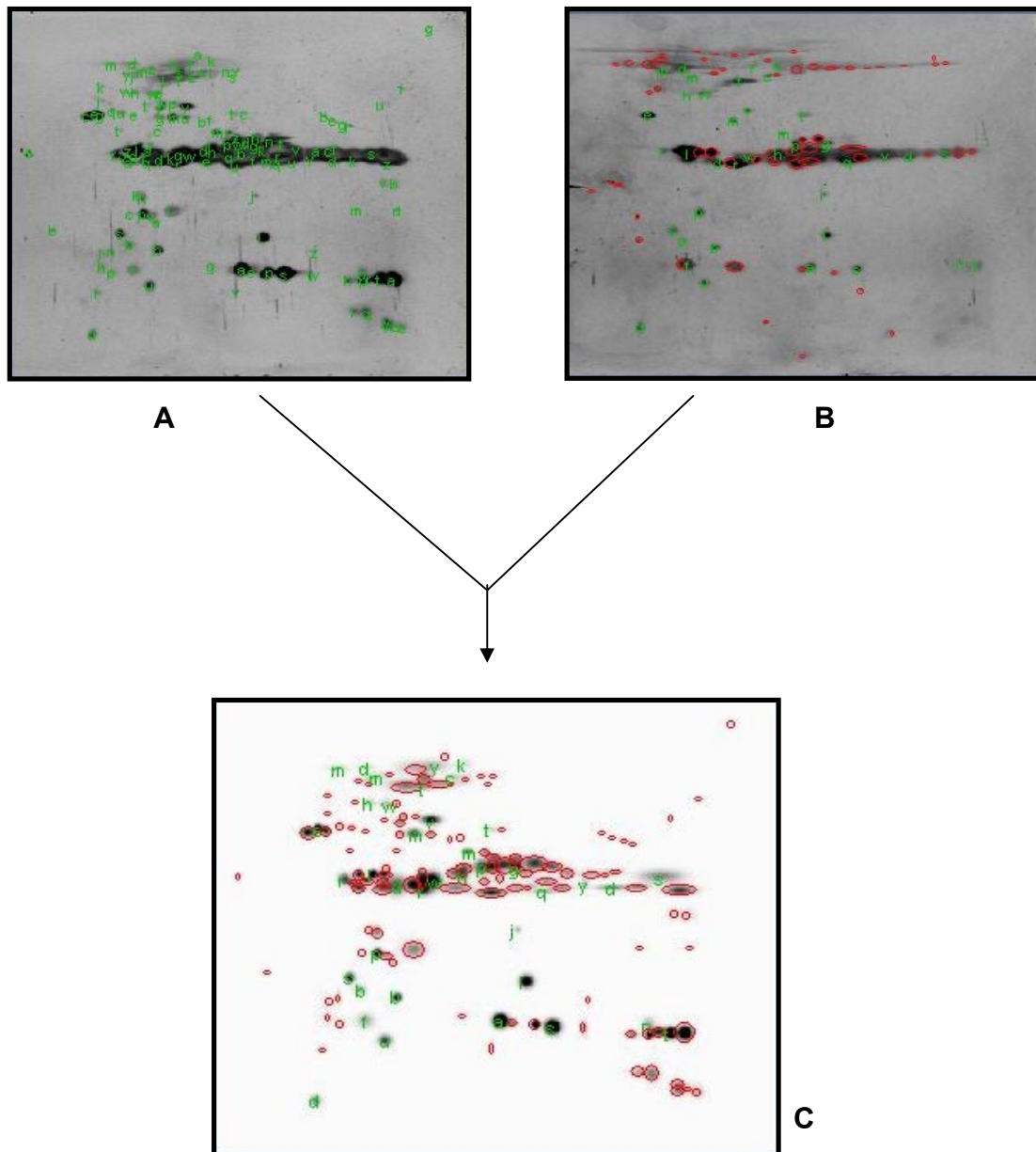


Figura 13. Gel Master originado del análisis con el software PDQuest. Se comparan dos gels de CaCU invasor (A) y (B) para crear el Master (C).

El número de manchas promedio obtenidas por el programa para cada patrón fueron los siguientes: Normal 111 manchas, positiva para VPH 80 manchas, NIC 1 59 manchas, NIC 3 146 manchas y CaCU Invasor 125 manchas.

El software nos indica en que pl y PM se encuentran las proteínas de los diferentes patrones obtenidos. En la siguiente tabla se muestran los pl y PM en promedio que se obtuvieron de cada región (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de pl y PM (KDa) de las proteínas de cada una de las regiones identificadas.

Región	Número de mancha	pl	PM (KDa)
A	1	5.4	18.8
	2	5.96	18.8
	3	6.45	18.8
B	1	7.3	16.62
	2	6.91	14.07
	3	7.67	12.9
C	1	4.52	17.76
	2	4.9	15.45
	3	5.28	15.3
	4	5.64	16.48
	5	5	17.4
	6	4.9	18

También se obtuvieron las intensidades de cada una de las manchas, el software normaliza todos los geles y elimina todas las interferencias, proporciona la cantidad de la mancha que la define como intensidad total de una mancha definida en el gel. Las manchas del control normal son tomadas como 1, si la intensidad es mayor se toma como 2, 3 ó 4 veces mas intensa que la normal y si se encuentra en menor concentración la tomamos como 0.8, 0.5 ó 0.25 veces menor comparado con la normal (Tabla 3).

Tabla 3. Intensidad de cada una de las manchas por región.

Región y número de mancha	Concentración de mancha				
	Normal *	VPH +	NIC1	NIC3	CaCU Invasor
A1	1	0.4	0.6	0.4	1
A2	1	1	0.8	0.6	0.7
A3	1	0.3	0.8	0.8	0
B1	1	0.5	0.8	0	1.6
B2	1	0.3	0.3	0	0.7
B3	1	0.3	0.4	0.007	0.5
C1	1	0.6	0.5	0.55	0.6
C2	1	0	0.5	0.43	0
C3	1	0	2	2	1
C4	1	2	1.3	1.5	2.5
C5	1	1	0	0	1.3
C6	1	0	0	0	1

* Valor normalizado para cada muestra analizada

Los datos cuantitativos obtenidos por medio del software PDQuest nos muestra que las manchas A1 de las muestras VPH + y NIC3 tienen menor intensidad que las otras muestras. En A2 la muestra se mantiene en casi la misma intensidad, mientras que en A3 es menor la intensidad en VPH + y CaCU Invasor. La región B se mantiene casi en todas las muestras con excepción de NIC3 que no se encuentra presente y por último la región C es muy variado su contenido de proteínas, C1 se mantiene, C2 no esta presente en VPH + ni en CaCU Invasor, C3 se pierde en VPH + y esta mas intensa la mancha en NIC1 y NIC3, C4 su nivel es mas alto en la mayoría de las muestras, C5 se pierde en NIC1 y NIC3, por último C6 se pierde en VPH +, NIC1 y NIC3 permaneciendo en normal y CaCU Invasor.

3.4 Análisis Western Blot

Se realizaron análisis por Western blot con anticuerpos donados por el Dr. Mauricio Salcedo del IMSS Siglo XXI (Tabla 6) para identificar si alguna proteína se esta expresando en sueros por los genes que el Dr. Salcedo encontró por medio de microarreglos de RNA mensajero en tejidos con alguna neoplasia cervical.

Se corrieron geles de acrilamida al 15% donde se utilizaron sueros normales, positiva para VPH y NIC3, se utilizaron anticuerpos contra p53, HOXB2, MMP1 e IL-1. (Figura 14).

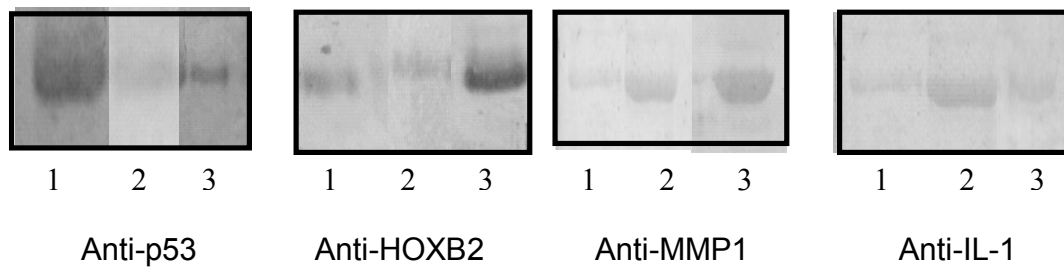


Figura 14. Western blot usando anti-p53, anti-HOXB2, anti-MMP1 y anti-IL-1 en sueros 1) normal, 2) positivo para VPH y 3) NIC3.

p53 es una proteína supresora de tumores lo cual indica que se encuentra presente en la muestra normal al igual que en las muestra positiva para VPH y NIC3 pero en mas bajo nivel. Esto indica que en una muestra normal la producción de la proteína p53 debe encontrarse presente pero en pequeñas cantidades y una vez que existe la presencia de la infección por VPH o en NIC3 esta se pierde por la presencia de E6 que interfiere con su función (Figura 14).

Se ha reportado que el homeobox HOXB2 se encuentra implicado en la formación de los tumores en diferentes cánceres (Segara y col., 2005). El resultado de Western blot nos muestra una mayor presencia de la proteína en NIC3 en comparación de suero normal y positivo para VPH (Figura 14).

La invasión tumoral y la metástasis son pasos claves en la progresión del cáncer al involucrar la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal. Las metaloproteinasas son enzimas proteolíticas y juegan un papel muy importante el aumento en los mecanismos de angiogénesis inducida por el tumor,

migración celular, proliferación, apoptosis y degradación del tejido conectivo (Vázquez y col., 2005). El nivel de MMP1 aumentó en los sueros de las pacientes con NIC 3 a diferencia con los normales lo cual indica que ya la sobreexpresión se lleva a cabo debido a que como ya hay presencia de tumor estas enzimas empiezan la invasión tumoral (Figura 14).

La IL-1 es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos. Se observó que la expresión en NIC 3 más que en los sueros normales y para VPH (Figura 14).

Estos son resultados cualitativos preliminares con lo cual como perspectivas podemos mencionar seguir con los análisis de Western blot ya que faltaría analizar un número mayor de muestras para que los resultados sean estadísticamente significativos y continuar con muestras que no se han analizado como NIC1, NIC 2 y CaCU invasor.

IV. DISCUSION

La proteómica es un campo que puede ayudar a determinar biomarcadores en enfermedad y constituye una herramienta importante en el análisis de proteínas.

Los patrones bidimensionales obtenidos de cada una de las muestras se encuentran diferencias en el contenido de proteínas. Identificamos cuatro regiones que denominamos como región A, B, C y D. En la siguiente tabla se resumen las características de los grupos y como se observa su contenido proteínico en las diferentes muestras analizadas (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las características de los grupos y número de proteínas presentes por región.

Región	pI	PM (KDa)	Número de proteínas presentes por región				
			Normal	VPH	NIC 1	NIC3	CaCU Invasor
A	5.4 – 6.5	~19	3	3	3	3	2
B	6.9 – 7.6	12– 17	3	3	3	2	3
C	4.9 – 5.7	15 – 18	6	3	4	4	5

La región A se ha reportado en un estudio proteómico de sueros infectados con el virus de la Hepatitis B (VHB) (Lau y col., 2003), tiene un patrón proteínico

como el de CaCU invasor. Este grupo fue identificado como haptoglobina. Las haptoglobinas tienen la capacidad de interactuar con hemoglobina plasmática y previene la pérdida de hierro a través de los riñones. La síntesis de haptoglobina está disminuida en los pacientes con enfermedades hepatocelulares, y aumentada en los procesos inflamatorios (Vivanco y col., 2005).

En la región E se han reportado algunos grupos de proteínas, por ejemplo para carcinoma hepatocelular (HCC) se identificó una isoforma de la alfa-fetoproteína en el suero de pacientes que presentaban el tumor, tras la escisión del tumor los niveles de expresión de la isoforma de la alfa fetoproteína disminuyeron. Por lo tanto lo consideran un potencial biomarcador para esta enfermedad (Poon y col., 2001).

Otro de los grupos reportados en esta región es la clusterina que se presenta en altos niveles en pacientes con preeclampsia. La clusterina es un heterodímero de 75-80 KDa, es una proteína multifuncional y su expresión se incrementa en enfermedades renales, neurodegenerativas, arteroesclerosis, infarto al miocardio y cánceres. Debido a que se encuentra expresada en diferentes enfermedades no se considera como un buen biomarcador para la preeclampsia por sí solo, por lo tanto se tiene que combinar con otros para poder hacer un diagnóstico temprano (Watanabe, 2004).

En las tres regiones en las que se muestra diferencias en el contenido de proteínas, la región A ya está identificada como haptoglobinas, mientras que en

las regiones B y C no se tienen reportes hasta el momento en la literatura en donde se haya realizado análisis proteómicos en sueros con diferentes enfermedades. Las proteínas que componen a las regiones B y C están en identificación por medio de espectrometría de masas (MALDI-TOF).

De los datos obtenidos de las encuestas realizadas a las pacientes cuyas muestras fueron procesadas para su análisis bidimensional, se observa que en la mayoría cuenta con uno o mas factores que se consideran de riesgo para el desarrollo de neoplasia cervical. Entre ellos esta la edad que esta en un rango de 30-75, inicio de la vida sexual temprana ya que la mayoría la inició entre edades de 15-18 años, algunas de ellas presentan multiparidad ya que han tenido de 5-10 hijos, la frecuencia con la que se realizan sus Pap es irregular y en el caso de número de parejas sexuales la mitad de las pacientes prefieren tener una pareja sexual, se ha documentado que en esos casos la pareja tenga mas parejas por lo tanto sea la portadora del virus.

Los datos obtenidos revelan que se pueden identificar diferencias en los patrones proteínicos en sueros de pacientes con diferentes grados de neoplasia cervical en comparación con el suero normal y estos resultados dan pauta a que estas proteínas las podamos utilizar como biomarcadores en cada uno de los diferentes estadios del CaCU.

El análisis proteómico enfocado al estudio del cáncer cérvicouterino en sueros puede ofrecer la oportunidad de explorar los perfiles proteínicos obtenidos

de cada muestra y así identificar proteínas que puedan servir como un biomarcador para realizar diagnóstico temprano y evitar que la enfermedad progrese a etapas avanzadas.

V. REFERENCIAS

- Aebersold R, 2003. Constellations in a cellular universe. *Nature* 422:115-116
- Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfio D, Talmadge K, Georgiou H, Quin M, Rice G. 2003. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics*. 3, 1980-1987.
- Alonso de Ruiz P, Lazcano-Ponce E y Hernández M. 2001. *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control*. Editorial Médica Panamericana.
- Anderson NL, Anderson N. 2002. The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 1:845-846.
- Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotech* 11:408-412
- Bailey. 2004. Low-abundance proteins raise the bar on biomarker research. *Agilent Technologies*. 21-24
- Baker TS, Newcomb W, Olson N, Cowset L, Olson C y Brown J. 1991. Structures of bovine and human papillomavirus. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 60:1445-1456
- Benitez L, Quiñonez G, 1990. El cáncer: ¿Un problema de salud en México? *Ciencia* 121-141
- Bocanegra Y. 2003. *El hospital de la mujer en su lucha contra el cáncer Cervicouterino*. Publicaciones Horizonte Sanitario
- Brinton LA, Fraumeni JF. Epidemiology of uterine cervical cancer. *J Chron Dis* 1986; 39:1051-1065
- Burd E. 2003 Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 1-17
- Celis JE, Ostergard M, Jense NA y cols. 199. Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe. *Federation of European Biochemical Societies*. 430(20292):24-72
- De Villiers E. 199. Heterogeneity of human papillomavirus group. *J Virol*, 63:498-4803
- Dexeus S, Cararach JM, Dexeus D. The role of colposcopy in modern gynecology. *Eur J Gynaecol Oncol*. 23:269-271

Dzul K, Puerto M, González M. 2004. Cáncer Cervicouterino: métodos actuales para su detección. Rev Biomed 15:233-241

Ferris DG. Officer Procedures. 1997. Primary care: Clin Office prac 24:241-267

Gaducci A, Cossio S, Carpii A, Nicolini A, Ricardo A. 2003. Serum Tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. J Biomed Pharmacotherapy 58:24-38

Gil C. La metodología proteómica: una herramienta para la búsqueda de función. Actualidad 2003, 35:12-20

Hanash S, Brichory F, Beer D. A proteomic approach to the identification of lung cancer markers. Disease Markers 17:295-300

Herrero R, Briton L, Reeves C, y Tenorio F. Sexual Behavior, venereal diseases, higiene practices and invasive cervical cancer in high-risk population. Cancer 65:30-386

Holowaty P, Miller A, Rohan T y, To T. 1999. Natural dysplasia of the uterine cervix. J Natl Cancer Inst. 91:252-258

<http://www.path.org>. "Natural history of Cervical Cancer: Even infrecuente screening of older women saves lives". Cervical cancer prevention fact Sheet. Program for Appropriate Technology in Health (PATH); Noviembre 2000.

Hubbard RA. 2003. Human papilomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med 127(8): 940-945

Lacruz C. 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001). Rev Esp Patol 36 (1):5-10

Lau A., He Q, Chiu J. Proteomic Technology and its biomedical application. Acta Biochemical et Biophysical Sinica 2003, 35 (11):965-975.

Lazcano Ponce E, Rojas-Martínez R, y López Acuña M. Factores de riesgo reproductivo y cáncer Cervicouterino en la ciudad de México. Sal Púb. Méx. 1986; 35:65-73

Massad LS, y Collins YC. 2003. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. Ginecol Oncol 89:424-428

Meehan K, Holland, Dawkins. 2002. Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer. The prostate. 50:54-63

Morita A. 2004. Differential Analysis of Ovarian Cancer patient using the multiple affinity removal system. Agilent Technologies.

Morris M, Tortolero-Luna G, LAlpica A, bacher VV, Cook E, Johnson E, y Mitchell MF. 1996. Neoplasia intrepitelial y cáncer Cervicouterino. En: Clínicas de Ginecología y Obstetricia. Temas actuales, Prevención del cáncer ginecológico. México. McGrawHill Interamericana; 315-339.

Muñoz N, y Bosh FX. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J mEd 337 (19):1386-1388

Ojeda JM, Prado R, Dabancens A. Infecciones genitales por virus papiloma. Rev Chil Infectol 1992; 9 2): 64-70

Palefsky JM, Holly EA. 1995. Molecular Virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. Cancer epidemiol biomarkers frequent. 4(4):415-428

Parkin DM, Pisan P, Ferlay J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1995. Int J Cancer 54:594-606

Petricoin E, Ardekani A, Hitt B, Levine P, Fusara V, Steinber S, Mills G, Simona C, Fishman D, Kohn E, Liotta L. Use proteomics patterns in serum to identify ovarian cancer. The prostate. 2002; 50:54-63

Petricoin E. 2002. Serum Protein patterns for detection of prostate cancer. J Natl Cancer Inst 94 (20):1576-1578

Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. En prensa

Poon T, Johnson P. Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers. Elsevier Science 2001; 231-239.

Rai A, Chan D. 2004. Cancer proteomics: serum disgnostics for tumor marker discovery. Ann NY Acad Sci 10022:286-294

Segara D, Biankin A, Kench J, Laungusch c, Dawson A, Skalicky d, Gotley D, Coleman M, Sutherland R, Henshall S. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. Clin Cancer Res 2005; 11(9):3587-3596.

Seow TK, Ong SE, Liang RC, Ren EC, Chan L, Ou R. 2000. Two-dimensional electrophoresis map of human hepatocellular cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry. Electrophoresis 21:1787-18313

Srinikas P, Srivastava S, Hanash S, Wright G. 2001. Proteomics in early detection of cancer. *Clinical Chemistry* 47(10):1901-1911

Stasyk T, Hellman U, Souchelnytski S. 2000. Optimizing sample preparation for 2D electrophoresis. *Life Sciences Amersham Biosciences*.

Suris JC, Dexeus S y López marin L. Epidemiology of preinvasive lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20 (4):302-305

The Celera genomics sequencing Team. 2001. *Science* 291:1304-1352

The international Human genome Mapping Consortium, 2001, *Nature*, 409:934-941

Vázquez G, Pina P, Vázquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, García J, Salcedo M. 2005. Overexpression of cathepsina F, matriz metalloproteinases 11 y 12 in cervical cancer. *Biomed Central*. 1-19.

Vivanco F, Martín-Ventura J, Duran M, Barderas M, Blanco-Colio L, Dardé V, Mas S, Meilhac O., Michel J, Tuñón J, Egido J. Quest for novel cardiovascular Biomarkers by proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* 2005.

Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, y Muñoz N. 1999. Human papilomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19

Watanabe H, Hamda H, Yamda N, Sohda S, Yamakawa-kobayashi K, Yoshikawa Hiroyuki, Arinami Tadao. Proteome analysis reveals elevated serum levels of clustein in patients with preeclampsia. *Proteomics* 2004, 4, 537-543.

Wells D y Weil D. 2003. Directions in automated sample preparations of proteins. *LC.GC Europe* 2-9.

Wick MJ. 2000. Diagnosis of human papilomavirus gynaecologic infections. *Clin Lab Med*. 20:271-287

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, y Sánchez JC. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and aminoacid analysis. *Bio/Technology* 14:61-65

Wittke S, Mischak H, Walden M, Kolch W, Räßler T, y Wiedemann K. 2005. Discovery of biomarkers in human urine and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry: Towards new diagnostic and therapeutics approaches. *Electrophoresis* 26: 1476-1487

Zhou G, Li H. 2D differential in gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein marker. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(2)177-124

ANEXO 1

SOLUCIONES PARA CORRIDA DE ISOELECTROENFOQUE

1. Stock Solución de rehidratación IPG Buffer (8 M Urea, CHAPS 4% (3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-1-propano sulfonato) y Azul de bromofenol 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
H2O bi-destilada		a 25 ml

*DTT (Ditiotrietol) 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.

0.5 % IPG Buffer (12.5 µl por 2.5 ml)

2. Stock de Azul de bromofenol

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

3. Buffer de equilibrio SDS (Dodecil sulfato de sodio)

	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 MilliQ		200 ml

4. SDS 10%

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

5. Persulfato de amonio 10%

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

6. 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 MilliQ		a 200 ml

7. Agarosa al 5%

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

8. Buffer de corrida

	Cantidad
Tris	6g
Glicina	28.8 g
SDS	1 g
Aforar con H ₂ O MilliQ	1 Lt

ANEXO 2

Protocolo para remover albúmina e IgG

1. Pipetear 30 μ L de suero humano en un tubo Eppendorf de 1 mL.
2. Adicionar 750 μ L de resina al tubo que contiene la muestra. Es esencial que la resina se encuentre en una suspensión uniforme para que sea homogénea.
3. Agitar por mínimo 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Al terminar el periodo de incubación, asegurar que la resina este en suspensión, y cuidadosamente pipetear la mezcla en la cámara superior de la columna la cual es colocada en el tubo de microcentrífuga.
5. Centrifugar aproximadamente 6500 rpm por 5 minutos
6. Descartar la cámara superior y recolectar el filtrado.
7. La muestra esta lista para ser usada.

ANEXO 3

Protocolo para la precipitación con acetona

1. Añadir 150 μL de acetona (-20°C) a 50 μL de muestra y vórtex.
2. Incubar a -20°C toda la noche.
3. Centrifugar a 10000 rpm por 30 min
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min para quitar todo el exceso de acetona de la pastilla y dejar secar.
6. Resuspender la pastilla en solución de rehidratación (Anexo 1)

ANEXO 4

Cuantificación por el método de Bradford

Curva de Calibración

1. Preparar BSA (Suero albúmina bovino) 1.4 mM.
2. Preparar diluciones de BSA como se muestran en la siguiente tabla:

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. 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. Incubar a temperatura ambiente por lo 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. Medir la absorbancia a 595 nm.

ANEXO 5

Rehidratación de la Tira.

1. La muestra es resuspendida en solución de rehidratación
2. Pipetear 125 μ L de la muestra en la bandeja
3. Remover la cubierta protectora del gel de la tira empezando del extremo ácido al básico esto debido a que se previene el daño del gel en el extremo básico ya que es mas sensible que el extremo ácido
4. La tira se coloca con el gel hacia abajo sumergiéndola en la muestra evitando la producción de burbujas.
5. Cubrir la tira con 3 mL de aceite de cubierta (Amersham) para minimizar la evaporación y cristalización de la urea.
6. La rehidratación se lleva a cabo a temperatura ambiente y es requerido un tiempo mínimo de 10 hrs, se recomienda dejarla toda la noche.

Corrida de Isoelectroenfoque.

1. Se coloca la charola de cerámica en el equipo Ettan IPGphor II y cada carril se llena con 9 mL de aceite de cubierta
2. Transferir la tira con el gel hacia arriba con el ánodo del lado positivo del equipo.
3. Colocar las esponjas en cada extremo de la tira previamente hidratadas en 125 μ L de agua destilada.

4. Colocar los electrodos asegurándose que estos toquen la plataforma del equipo y seguir las siguientes condiciones de corrida.

Condiciones de corrida para la separación por isoelectroenfoque

Longitud de la tira	Rango de pH	Paso y modo de voltaje	Voltaje (V)	Duración (h:min)	Volt-horas (kVh)
7 cm	3 – 10	1 Gradiente	500	0:01	0.01
		2 Gradiente	4000	2:30	5.6
		3 Step and hola	5000	0:30	2.5
		Total		3:00	8.0
13 cm	3 - 10	1 Gradiente	500	0:01	0.01
		2 Gradiente	4000	2:30	5.6
		3 Step and hola	8000	2:10	10.0
		Total		4:40	15.6

ANEXO 6

Protocolo para la tinción con plata

Protocolo de tinción con plata se utilizó el SilverXpress Silver Staining Kit (Invitrogen).

Preparar las soluciones como se describe en la tabla.

1. Se incuba el gel con la solución fijadora durante 20 min.
2. Decantar la solución fijadora y se incuba el gel en 2 cambios de solución de sensibilizadora.
3. Decantar la solución de sensibilizadora y lavar el gel con dos cambios de agua ultra pura de 10 min. cada uno.
4. Incubar el gel en solución stainer por 30 min.
5. Decantar la solución de teñido y lavar el gel con dos cambios de agua ultra pura de 10 min. cada uno.
6. Incubar el gel con la solución reveladora hasta que la intensidad de las manchas sea la deseada. (Aprox. 3 – 15 min.)
7. Adicionar la solución stop directamente al gel, cuando la intensidad sea la deseada.
8. Decantar la solución de paro y lavar con agua ultra pura.

Soluciones para la tinción con plata

Solución	Componentes	1 Gel (mL)	2 Gel (mL)	3 Gel (mL)	4 Gel (mL)
Solución fijadora	Agua ultra pura	90	180	270	360
	Metanol 50%	100	200	300	400
	Ácido Acético 10%	20	40	60	80
Solución sensibilizadora	Agua ultra pura	105	210	315	420
	Metanol 50%	100	200	300	400
	Sensibilizador	5	10	15	20
Solución stainer	Colorante A	5	10	15	20
	Colorante B	5	10	15	20
	Agua ultra pura	90	180	270	360
Solución reveladora	Agua ultra pura	95	190	285	380
	Desarrollo	5	10	15	20
Solución de paro (stop)	Solución de paro (stop)	5	10	15	20

Tinción con SYPRO Ruby

El gel se fija en una solución con metanol 50% / ácido acético 10% a temperatura ambiente por 15 minutos y se repite este paso (2 veces). Se siguen los siguientes pasos:

- a) **Incubar el gel en SYPRO Ruby sin diluir.** Para obtener una mejor tinción en los geles 1-D o 2-D, se incuba el gel toda la noche con el SYPRO. Se logra una excelente sensibilidad después 3-4 horas.

- b) **Lavar el gel.** Para reducir el fondo fluorescente e incrementar la sensibilidad se hacen 2 lavados en metanol 10% (o etanol), ácido acético 7% por 30 minutos. El gel puede ser monitoreado periódicamente utilizando un transiluminador UV para determinar el nivel de fondo fluorescente adecuado.

c) Visualización. La tinción con SYPRO Ruby tiene dos longitudes de onda máximas, una de aprox. 280 nm y otra de aprox. 450 nm, y tiene una longitud de onda 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.