

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL INGENIERIA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

MAYRA LEÓN ESTRADA

NOMBRE DEL PROYECTO:

“ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA SER ANALIZADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (2D-PAGE) PARA EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ÓMICAS DE ECOSUR”

PERIODO DE REALIZACIÓN:

ENERO –JUNIO 2014

ASESOR INTERNO:

Q.F.B DULCE MARÍA HERNÁNDEZ BERISTAIN

ASESOR EXTERNO:

DRA. IRENE SÁNCHEZ MORENO

REVISORES:

DRA. PATRCIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE

DR. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

Índice

1. Introducción.....	5
2. Justificación.....	6
3. Objetivos.....	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Caracterización del área.....	8
5. Problemas a resolver.....	11
6. Alcances y limitaciones	11
6.1 Alcances.....	11
6.2 Limitaciones.....	11
7. Marco teórico.....	12
7.1 Ciencias ómicas	12
7.1.1 Proteómica.....	12
7.1.2 Ramas de la proteómica	14
7.1.3 Estrategias de estudio en proteómica.....	16
7.1.4 Aproximación clásica de la estrategia Bottom-Up	16
7.1.5 Aproximación shotgun de la estrategia Bottom-Up.....	17
7.1.6 Estrategia o proteómica top-down.....	18
7.1.7 Técnicas experimentales y herramientas proteómica.....	18
7.2 Electroforesis	19
7.2.1 Fundamento	19
7.3 Tipos de electroforesis	20
7.3.1 Electroforesis libre.....	20
7.3.2 Electroforesis zonal	21
7.3.3 Electroforesis SDS-PAGE.....	21
7.4 Preparación del soporte.....	23
7.5 Preparación de la muestra	24
7.6 Electroforesis en dos dimensiones.....	25
7.6.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	25
7.6.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE.....	27

7.7	Biofluidos.....	28
7.7.1	Saliva	28
7.7.2	Orina	28
8	Procedimiento y descripción de las actividades realizadas	29
8.2	Preparación de la muestra	29
8.2.1	Muestras de orina	30
8.2.2	Muestras de saliva.....	32
8.3	Electroforesis	33
8.4	Electroforesis en dos dimensiones.....	34
9	Resultados.....	35
10	Conclusiones.....	43
11	Recomendaciones	43
12	Bibliografía.....	44
13	Anexos	48

Índice de cuadros

No. tabla		pág.
1	PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN ENSAYO 1 Y 2	31
2	PREPARACIÓN PARA LA MUESTRA DE ORINA. ENSAYO 1.....	32
3	PREPARACIÓN PARA LAS MUESTRAS DE ORINA VESPERTINA Y DIURNA. ENSAYO 2.....	32
4	PREPARACIÓN PARA LAS MUESTRAS DE SALIVA DÍA Y NOCHE.	33
5	DISTANCIAS RECORRIDAS Y PESOS ESTIMADOS.....	37
6	CONCENTRACIÓN DE PROTEINA BSA	37
7	CONCENTRACION DE PROTEÍNA EN ORINA.....	38
8	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE ORINA-DÍA	39
9	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN MUESTRAS DE ORINA-NOCHE	39
10	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN MUESTRAS DE SALIVA-DÍA	40
11	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN MUESTRAS DE SALIVA-NOCHE	41

Índice de figuras

No. Fig.	pág.
4	PERTURBACIONES AMBIENTALES O EXPERIMENTALES QUE PUEDEN CAMBIAR ENORMEMENTE A LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EN UNA CÉLULA, INCLUSO CUANDO LOS CAMBIOS EN EL CÓDIGO DE ADN SON MENORES O AUSENTES..... 13
5	RAMAS DE LA PROTEÓMICA 15
6	ELECTROFORESIS LIBRE 21
7	ELECTROFORESIS ZONAL..... 21
8	ESTRUCTURA DE LA ACRILAMIDA, BISACRILAMIDA Y POLIACRILAMIDA 23
9	POLIMERIZACIÓN DEL SOPORTE 24
10	DIFERENTES METODOLOGÍAS PUEDEN COMBINARSE EN ESTUDIOS PROTEÓMICOS. METODOLOGÍAS MÁS COMÚNMENTE UTILIZADAS QUE IMPLICAN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MUESTRA, LA SEPARACIÓN POR UNO-(1-D) O DE DOS DIMENSIONES (2-D) DE ELECTROFORESIS Y/O CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, LA IONIZACIÓN, LA FRAGMENTACIÓN, EL PÉPTIDO EL ANÁLISIS Y LA DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS DE DATOS. 25
11	UNA MEZCLA DE PROTEÍNAS SE RESUELVE EN UNA TIRA DE IPG DE pH 3-10 DE ACUERDO CON SU pI DE CADA PROTEÍNA E INDEPENDIENTEMENTE DE SU TAMAÑO, COMO SE DESCRIBE EN LA SECCIÓN DE IEF. 26
12	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE MUESTRA LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE DESPUÉS DE LA SEPARACIÓN POR IEF. 27
13	ESQUEMA DE ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)..... 35
15	ELECTROFORESIS DEL EXTRACTO TOTAL DE PROTEÍNAS CONTENIDAS EN ORINA HUMANA. 38
16	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DEL EXTRACTO TOTAL DE PROTEÍNAS EN ORINA HUMANA..... 39
17	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DEL EXTRACTO TOTAL DE SALIVA HUMANA..... 40
18	ELECTROFORESIS EN 2D-PAGE. PROTOTIPO DEL ANÁLISIS DE SALIVA HUMANA 42

1. Introducción

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es una herramienta útil para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Esta técnica fue descrita originalmente por O'Farrell (Farrell, 2010). La innovación clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) pues, éste elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga derivados del uso de gradientes de pH preparados con anfolitos transportadores. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas inmovilinas y está copolimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada, lo que ha hecho posible la comparación de mapas entre distintos laboratorios, facilitando el intercambio de información y convirtiendo a esta técnica en el estándar para el análisis proteómico. (Righetti, 2007)

En la era post-genómica, la proteómica ha conseguido integrar un conjunto de metodologías indispensables por su elevada precisión y eficacia, como herramientas con las que llevará a cabo el análisis de proteínas a gran escala. Inicialmente definido por M. Wilkins en 1994 como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma, el término “proteoma” fue rápidamente aceptado, así como el vocablo derivado “proteómica”, algo más ambiguamente definido como un área o campo del conocimiento más que como una rama del saber acotada y estática. La proteómica podría así definirse como el uso de medidas cuantitativas de la expresión génica a nivel de proteínas con el fin de caracterizar procesos biológicos (como por ejemplo el desarrollo de una enfermedad o el efecto de un fármaco) y descifrar los mecanismos de control de la expresión genética. (Ong, 2002).

Uno de los enfoques fundamentales en la proteómica es el uso de electroforesis en gel de dos dimensiones como un modo de separación y visualización de mezclas complejas de proteínas. A pesar de varias limitaciones del método, su capacidad para separar grandes cantidades de proteínas, incluida su modificación después de la traducción, asegura que seguirá siendo popular en varias áreas bien definidas de la proteómica. (Ong & Pandey, 2001).

La presente investigación aborda los procedimientos para estandarización de la preparación de muestras biológicas destinadas a ser analizadas mediante la técnica de Electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) para el laboratorio de investigación en Ciencias Ómicas de ECOSUR. Se realizaron análisis electroforéticos en muestras de fluidos humanos como orina, sangre y saliva, enfocado particularmente al área de proteómica, se estandarizó el primer paso de la electroforesis que es la preparación de la muestra, muy importante durante el proceso, ya que de ella depende el éxito o fracaso de la técnica a utilizar. Dichos fluidos, son muestras complejas debido a sus componentes ya que presentan algunas dificultades al momento de llevar el procedimiento. El trabajo realizado aporta metodologías para poder utilizar las muestras con mayor eficacia y obtener un mejor resultado, y estos puedan ser utilizados con éxito para posteriores análisis como en espectrometría de masas, huella peptídica, entre otros.

2. Justificación

La separación y purificación de proteínas son necesarias para llevar a cabo el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Para ello, éstas deben ser separadas selectivamente a partir de muestras complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado. Los métodos de separación se basan en diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga eléctrica, entre otras. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis. (Rabanales & Ochoa, 2006)

La preparación de la muestra es imprescindible para experimentos en ciencias ómicas. Las consideraciones primarias en experimentos proteómicos son la concentración de proteínas, la purificación de la muestra, la digestión de proteínas, además de su captura por afinidad y el fraccionamiento de la muestra (usando bases de gel o técnicas cromatográficas) para reducir la complejidad del fluido. Se hace hincapié de manera diferente a estos pasos, dependiendo de la muestra biológica que se utiliza (Horgan, Clancy, Myers, & Baker, 2009).

Es por ello que se realizará la estandarización del primer paso de la electroforesis en dos dimensiones, que consiste en la preparación de la muestra de los fluidos corporales (saliva y orina), dentro de la cual se eliminan sales, lípidos, detritos celulares y proteínas funcionales representativas como albumina de suero, amilasa de saliva, así como de urea en la orina. Se realizan procedimientos de concentración, dilución y la cuantificación validada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y así implementar la técnica de manera adecuada para diferentes áreas de estudios, especialmente enfocado a las ciencias ómicas, en particular en el área de la proteómica. Lo anterior se realizará en el laboratorio de ciencias ómicas del Ecosur unidad San Cristóbal, dependiente del área de Salud Sociedad y Cultura.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Estandarizar los procedimientos para la preparación de muestras biológicas destinadas para utilizarse en la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) para aplicarse en el laboratorio de investigación.

3.2 Objetivos específicos

- Estandarización de la metodología para muestras de orina para la eliminación de los componentes predominantes del fluido que interfieren en la electroforesis
- Estandarización en la metodología para muestras de saliva para la eliminación de los componentes predominantes del fluido que interfieren en la electroforesis

4. Caracterización del área

Las actividades realizadas se llevaron a cabo en el colegio de la frontera sur (ECOSUR) unidad San Cristóbal, específicamente en el laboratorio de ciencias ómicas. Dicha institución se encuentra ubicada en Carretera Panamericana y Periférico Sur, S/N, Barrio María Auxiliadora, en la ciudad de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. (figura 1)



Figura 1 Ubicación del Colegio de la frontera sur

ECOSUR se encuentra bajo la dirección del Dr. Mario González Espinosa, cuenta con cinco departamentos de investigación los cuales son:

- Sistemática y ecología acuática.
- Sociedad, cultura y salud.
- Agricultura, sociedad y ambiente.
- Ciencias de la sustentabilidad.
- Conservación de la biodiversidad.



Figura 2 Entrada principal Ecosur San Cristóbal

El departamento de investigación a la cual esta enfoca la residencia es sociedad, cultura y salud. El principal propósito del Departamento de Sociedad, Cultura y Salud (DSCS) es analizar de manera integral, la problemática sociocultural, de salud y de las dinámicas migratorias y socioambientales que afronta la frontera sur de México, así como investigar alternativas de solución a dicha problemática. Para ello, el trabajo desarrollado por este Departamento, procura aportar elementos que posibiliten: la formación de recursos humanos de alto nivel, potenciar las capacidades sociales, tanto de manera local como regional, así como contribuir a la generación de alternativas para afrontar las situaciones de pobreza, marginación, desigualdades sociales y necesidades básicas no satisfechas en la región.

El DSCS tiene presencia en las cinco unidades de ECOSUR (San Cristóbal, Tapachula, Villahermosa, Campeche y Chetumal) y está conformado por 25 investigadores de diferentes ámbitos de las ciencias sociales, distribuidos en los siguientes cuatro grupos académicos:

- Investigación en Salud, en el que se llevan a cabo estudios en el campo de la salud humana y sus determinantes sociales, a partir de aproximaciones epidemiológicas, de biología molecular y toxicología ambiental.
- Procesos Culturales y Construcción Social de Alternativas, grupo que investiga la dimensión cultural de diversos fenómenos y procesos socioeconómicos y políticos en la frontera sur de México y sus nexos con Centroamérica y el Caribe.
- Estudios Transfronterizos, en el que los procesos migratorios constituyen uno de sus ejes centrales y en el que se estudia la problemática social de la frontera sur desde una perspectiva regional, multidimensional y transfronteriza.
- Estudios de Género, en el que se analizan las formas históricas y culturales de construcción de las relaciones inequitativas de poder y su papel en la reproducción de la pobreza, así como las formas en que el género incide en los fenómenos sociales de la frontera sur.

Particularmente la residencia se llevara a cabo en el laboratorio de ciencias ómicas a cargo de la Dra. Irene Sánchez Moreno

ECOSUR cuenta con una estructura organizacional, como se puede observar en la figura 3.

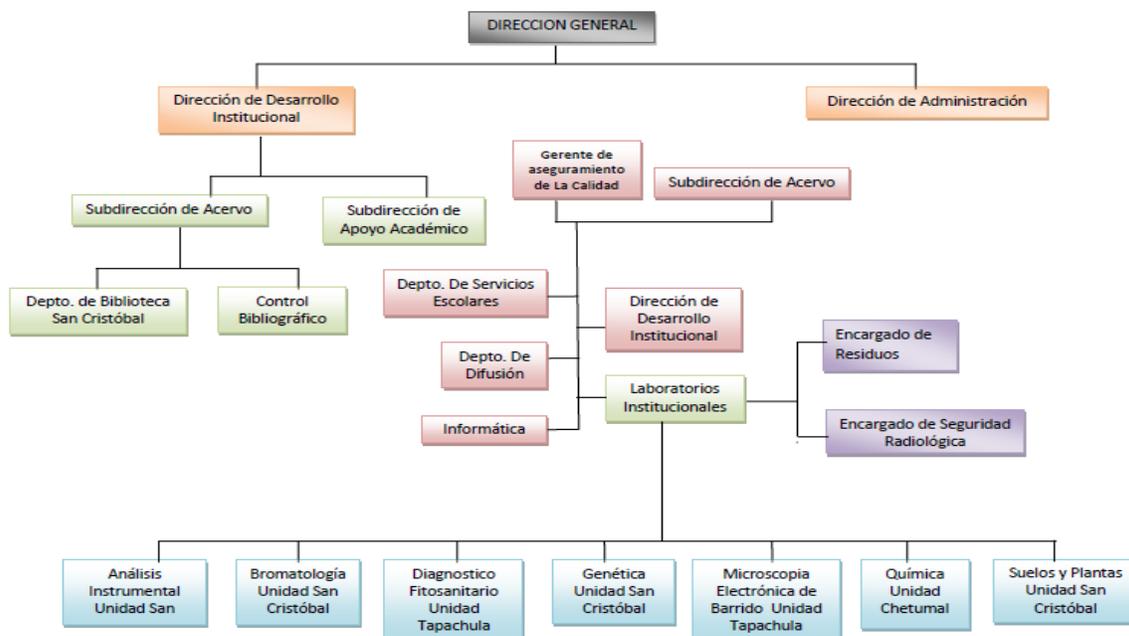


Figura 3 Organigrama de Ecosur

Misión

El Colegio de la Frontera Sur es un centro público de investigación científica, que busca contribuir al desarrollo sustentable de la frontera sur de México, Centroamérica y el Caribe a través de la generación de conocimientos, la formación de recursos humanos y la vinculación desde las ciencias sociales y naturales.

Visión

Comprometidos con la generación de capacidades técnicas en el ámbito local y regional, buscando fortalecer la educación superior, el desarrollo productivo y social, y los procesos de descentralización para el desarrollo.

5. Problemas a resolver

En la actualidad existen muchas técnicas para la separación de proteínas, en particular en las ciencias ómicas, en especial la proteómica utiliza la electroforesis en dos dimensiones para separar miles de proteínas al mismo tiempo. Sin embargo, dicha técnica es muy sensible a la muestra problema a tratar, es por ello que en el presente estudio de investigación se propone estandarizar las metodologías para la eliminación de componentes predominantes en los fluidos biológicos orina y saliva tales como sales, lípidos, detritos celulares y proteínas funcionales representativas como albumina de suero, amilasa de saliva, así como de urea en la orina como la orina y saliva, ya que estos dificultan la apreciación de las proteínas en la resolución del gel de poliacrilamida. Los resultados obtenidos se aplicaran en el análisis de enfermedades como la preeclampsia en mujeres embarazadas en otra parte del proyecto.

6. Alcances y limitaciones

6.1 Alcances

Se logró la estandarización de la metodología utilizada para la preparación de la muestra de orina.

Para la muestra biológica de saliva la estandarización no se logró, debido a que la compra de reactivos no se hizo a tiempo para modificar la técnica; por lo que no se pudieron implementar los procedimientos para neutralizar el pH de la muestra.

6.2 Limitaciones

No se contó con el financiamiento a principios de año para realizar y gestionar los diferentes materiales que se utilizarían en las metodologías para estandarización de la muestra, e iniciar lo más pronto posible, por ello se tuvo que esperar un tiempo para adquirir los materiales necesarios para la estandarización de las muestras problemas.

Para la electroforesis en dos dimensiones aún no se cuenta con el equipo apropiado que cumpla las características que se necesitan como es un alto voltaje, para llevar de manera apropiada la técnica y obtener resultados satisfactorios.

7. Marco teórico

7.1 Ciencias ómicas

Los avances logrados tanto en el campo de la biología como en el campo de la bioinformática han abierto un abanico de posibilidades para una nueva mentalidad en la que se desarrolla una visión global de los procesos biológicos. Este concepto de globalización, se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como “La era ómica”. El sufijo “-oma” tiene origen del Latín y que significa “conjunto de”. Es por tanto que, la adición de este sufijo a diferentes estudios en biología, cubre las nuevas aproximaciones masivas en las que se está enfocando la biología recientemente. Obtenido de <http://cienciasomicas.wordpress.com/2011/05/12/hello-world/>

El concepto de ciencias ómicas recoge aquellas disciplinas como la genómica, la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica. Todas ellas aportan grandes avances en el conocimiento básico de los temas biológicos. Además, suponen un enorme desarrollo en el campo del análisis de la funcionalidad celular y en sus aplicaciones biotecnológicas. Gracias al proyecto genoma humano y al éxito obtenido en localizar y secuenciar todos los genes que constituyen el genoma humano se adquiere un conocimiento completo de la organización, estructura y función de los genes en los cromosomas humanos y deja abierto un campo de investigación muy grande para cualquier sistema biológico. (Pando V. & Ferreira C., 2002)

7.1.1 Proteómica

El término proteoma fue acuñado en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en un tejido o en una célula. El proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos, o su estado fisiológico (normal o patológico). (Robles & Batista, 2003). El análisis del proteoma es una medición directa de las proteínas en términos de su presencia y abundancia relativa (Wilkins et al 1996). El objetivo general de un estudio proteómico es la caracterización de la compleja red de regulación celular. Ni el código de ADN genómico de un organismo ni la cantidad de ARNm que es expresada para cada producto génico (proteína) se obtiene una precisión de imagen del estado de una célula viva (Lubec et al. 1999), el cual puede alterarse por varias afecciones (Figura 4). El proteoma requiere de un análisis para determinar qué proteínas han sido condicionalmente expresadas, con qué fuerza, y si algunas modificaciones postraduccionales se ven afectadas. Dos o más diferentes estados de una célula o de un organismo (por ejemplo, el tejido sano y

enfermo) pueden ser comparados y un intento de hacer para identificar los cambios específicos de la proteína cualitativos y cuantitativos.

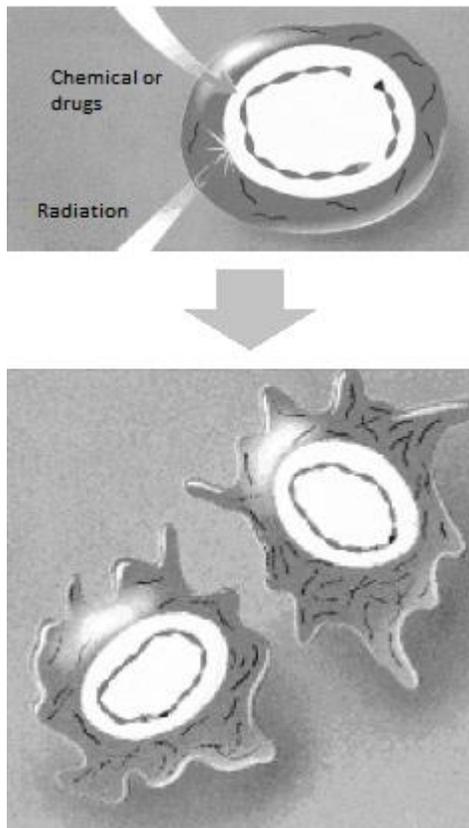


Figura 4 Perturbaciones ambientales o experimentales que pueden cambiar enormemente a las proteínas expresadas en una célula, incluso cuando los cambios en el código de ADN son menores o ausentes.

El crecimiento en el número de proyectos de investigación orientados al estudio de los genomas de forma sistemática, ha dado lugar a la aparición de nuevas tecnologías a gran escala (de alto rendimiento) que, en el caso de las proteínas, se denomina *Proteómica*. Esta puede dividirse en *proteómica de expresión*, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, fluido, tipo celular u organelo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica, y *proteómica funcional*, que se encarga del estudio de la función de proteínas dentro de sistemas biológicos (relaciona cambios de expresión con una función determinada) y la regulación de su expresión, incluyendo las interacciones proteínas-proteína, proteínas-ADN, proteínas-ARN y las modificaciones postraduccionales. (Robles & Batista, 2003)

En 2001, la organización del proteoma humano postula los objetivos de la proteómica de manera más precisa en cuanto a la identificación de todas las proteínas codificadas por el genoma humano (y de otros genomas, especialmente los de los organismos modelo) con la posterior evaluación de:

- a) Su proteína de expresión en diferentes tipos de células del organismo (proteómica de expresión)
- b) Distribución de las proteínas en compartimentos subcelulares de los orgánulos
- c) Modificaciones post traduccionales de las proteínas
- d) Interacciones proteína-proteína (b-d constituyen la proteómica estructural)
- e) La relación entre la estructura y función de la proteína (proteómica funcional)

El proteoma también cambia en respuesta al cáncer y otras enfermedades, haciendo al proteoma de gran interés para las investigaciones médicas. Por ejemplo, las células cancerosas a menudo secretan proteínas específicas o fragmentos de proteínas en el torrente sanguíneo y otros fluidos corporales tales como la orina y la saliva. (Barh, 2013).

7.1.2 Ramas de la proteómica

La separación de proteínas

Todas las tecnologías proteómicas se basan en la capacidad de separar una mezcla compleja de modo que las proteínas individuales se procesan más fácilmente con otras técnicas (Figura 5).

Identificación de proteínas

Métodos bien conocidos incluyen la secuenciación de bajo rendimiento a través de la degradación de Edman. Las técnicas proteómicas de alto rendimiento se basan en la EM, por lo general péptido masiva de huellas dactilares en los instrumentos similares o la secuenciación de novo de detección de la repetición en instrumentos capaces de más de una ronda de la EM. Ensayos basados en anticuerpos también se pueden utilizar pero son únicos para un motivo de secuencia

La cuantificación de proteínas

Se utilizan métodos basados en gel, incluyendo tinción diferencial de geles con colorantes fluorescentes (electroforesis en gel diferencial). Métodos libre de gel que incluyen diversos métodos de modificación química, como las etiquetas de isótopos con código de afinidad (ICATs), marcadores de afinidad de metal con código, o cromatografía diagonal fraccional combinada. (*Barh, 2013*)

Análisis de la secuencia de proteínas

Esta es una más de las ramas bioinformáticas, dedicada a la búsqueda de bases de datos para una posible proteína o péptido partidos, así como la asignación funcional de dominios, la predicción de la función de la secuencia, y las relaciones evolutivas de proteínas.

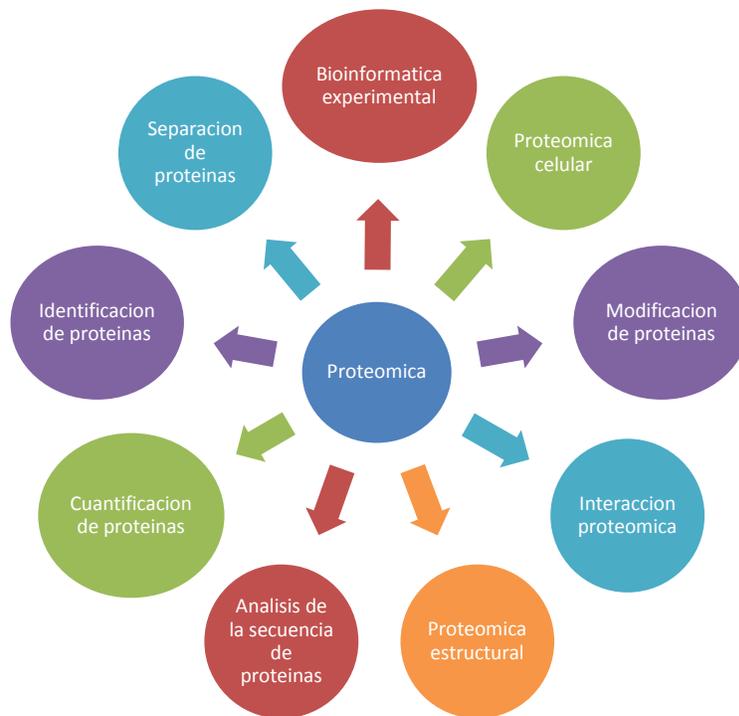


Figura 5 Ramas de la proteómica

Proteómica estructural

Esto se refiere a la determinación de alto rendimiento de estructuras de proteínas en el espacio tridimensional. Los métodos comunes incluyen la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Interacción proteómica

Se refiere a la investigación de interacciones de proteínas en los niveles atómicos, moleculares (interacción proteína-proteína).

Modificación de Proteínas

Casi todas las proteínas son modificadas a partir de su secuencia de aminoácidos, llamada modificación postraduccional. Métodos especializados se han desarrollado para estudiar la fosforilación (fosfoproteómica) y la glicosilación (glicoproteómica).

Proteómica celular

Esta es una nueva rama de la proteómica, cuyo objetivo es mapear la localización de las proteínas y las interacciones proteína-proteína en las células enteras durante los eventos

clave de las células. Se centra en el uso de técnicas como la tomografía de rayos X y la microscopía de fluorescencia óptica.

Bioinformática experimental

Una rama de la bioinformática, ya que se aplica en la proteómica, acuñado por Matthias Mann. Implica el diseño mutuo de los métodos experimentales y la bioinformática para crear (extraer) los nuevos tipos de información de los experimentos de proteómica. (Barh, 2013)

7.1.3 Estrategias de estudio en proteómica

El esquema general de análisis de un proteoma implica una primera etapa de preparación de la muestra, una segunda de separación de los analitos, un análisis de estos por espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry) y finalmente un análisis exhaustivo de los datos que se han obtenido. Todas estas etapas desembocan en la caracterización y/o cuantificación de las proteínas contenidas en la muestra original.(Mouriño, 2008)

De forma paralela al nuevo entendimiento sistémico que la nueva biología del siglo XXI está demandando, a día de hoy, la proteómica está viviendo animosa entre dos tipos de estrategias de estudio.

- Estrategia o proteómica Bottom-Up (analiza las partes: péptidos)
- Estrategia o proteómica Top-Down (analiza los todos: proteínas intactas)

Aunque todavía no existe consenso científico en cuanto a una correcta definición de ambas estrategias, la diferencia metodológica que actualmente tiene más adeptos reside en que ambas estrategias se diferencian en función de “que es lo que está analizando”, por un lado “las partes”, o péptidos (Bottom-Up), y por la otra “los todos” o las proteínas (Top-Down).

Estrategia o proteómica Bottom-Up

La estrategia Bottom-up se basa en la identificación de las proteínas de interés, a partir del estudio de sus péptidos, mediante dos aproximaciones diferentes:

- Aproximación clásica
- Aproximación Shotgun o de segunda generación

7.1.4 Aproximación clásica de la estrategia Bottom-Up

Aunque ciertas separaciones cromatográficas también podrían ser aplicadas para la obtención de una determinada fracción de proteínas, la aproximación clásica de la proteómica Bottom-Up comienza típicamente con la separación electroforética de la mezcla

compleja de proteínas en geles de poliacrilamida de una (1-DE, *One Dimensional gel Electrophoresis*), o dos dimensiones (2-DE, *Two Dimensional gel Electrophoresis*). Las proteínas resueltas en el gel son entonces visualizadas utilizando distintas tinciones convencionales y seguidamente, los geles son escaneados y sometidos a análisis de imagen mediante diferentes programas informáticos desarrollados para tal fin. La caracterización e identificación de las especies proteicas de interés, se lleva a cabo mediante la digestión *en gel* con enzimas, tales como la tripsina, y los péptidos así formados son analizados mediante MS. En la mayoría de los casos, pero no siempre, se recurre a la separación de la mezcla de péptidos, por medio de sistemas de cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*) acoplada a los equipos de MS. Esta estrategia “clásica” es la más utilizada hasta el momento, principalmente en estudios de proteómica de expresión y proteómica de expresión diferencial. Se trata de una aproximación basada normalmente en la separación mediante geles 2-DE, que ofrece una buena resolución y compatibilidad aunque adolece de reproducibilidad, es difícil de estandarizar y automatizar, y no permite el análisis de todos los componentes de un determinado proteoma, ya que presenta un rango dinámico limitado. (Mouriño, 2008)

7.1.5 Aproximación shotgun de la estrategia Bottom-Up

El termino Shotgun (del inglés, escopeta), se refiere al estudio de las proteínas contenidas en una muestra a partir del análisis directo y rápido de la mezcla compleja de péptidos resultantes de su digestión enzimática (Wu & MacCoss, 2002). En esta aproximación se emplean digestiones peptídicas completas, obtenidas a partir de mezclas de proteínas, sin necesidad de una separación previa mediante 2-DE u otro procedimiento cromatográfico. Posteriormente la mezcla de digeridos peptídicos se somete a separaciones cromatográficas multidimensionales, acopladas en una última etapa, a un espectrómetro de masas como detector. Este finalmente induce a la fragmentación de los péptidos, conforme van eluyendo de la columna. Típicamente la separación se realiza en dos dimensiones, atendiendo a dos propiedades diferentes de los péptidos, primero según su carga utilizando para ello una LC de intercambio catiónico fuerte (SCX, *Strong Cation eXchange*) y posteriormente según su hidrofobicidad, empleando una LC en fase reversa (RP, *Reverse Phase*). Sin embargo, si la suma de péptidos a analizar no es muy compleja, el análisis Shotgun puede ser realizado sirviéndose simplemente de una única separación cromatográfica, normalmente utilizando una LC en RP. Finalmente, se realiza la comparación bioinformática de las fragmentaciones obtenidas frente a las fragmentaciones *in silico* de las proteínas contenidas en las bases de datos, lo que da lugar a la identificación de los péptidos y consecuentemente de las proteínas presentes en la muestra de partida.

Mediante esta metodología (Link et al.,1999) identificaron 1,484 proteínas diferentes de un proteoma de *Haemophilus influenza*, en un único experimento, y de forma automática, mientras que el mismo proteoma, analizado mediante un típico experimento de proteómica Bottom-Up clásica, solamente permitió la identificación de 502 proteínas diferentes (Langen et al, 2000).

7.1.6 Estrategia o proteómica top-down

La estrategia o proteómica Top-Down (de arriba hacia abajo), se centra exclusivamente en la caracterización e identificación de proteínas intactas a partir del análisis por MS de las mismas, sin necesidad de recurrir al análisis de sus péptidos (Kelleher, 2004; Bogdanov & Smith, 2005). Esta aproximación identifica las proteínas determinando su masa molecular relativa (M_r) y/o junto con la fragmentación de los iones proteicos obtenidos, generando así información sobre su secuencia. Para ello, es necesario utilizar espectrómetros de masas de alta resolución, tales como el espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones por Transformada de Fourier (FTICR, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) (Bagdanov & Smith, 2005), o las trampas iónicas tipo Orbitrap (Hu et al., 2005), capaces de aislar iones proteicos, determinar su envoltura isotópica e inducir su fragmentación. Esta estrategia confía también en la búsqueda mediante bases de datos, facilitando la interpretación de la secuencia y la identificación de la proteína de interés. Recientemente, (Han et al., 2006) han demostrado la posibilidad de realizar estudios de proteómica Top-Down y obtener fragmentación altamente informativa a partir de proteínas mayores de 200 kDa. La proteómica Top-Down ofrece ciertas ventajas con respecto a la proteómica Bottom-Up a la hora de la detección de PTMs, sustituciones aminoacídicas, truncamientos, etc. Tanto la estrategia Bottom-Up, como la Top-Down, presentan una serie de ventajas y desventajas particulares. Aunque la estrategia Bottom-Up es la más sencilla y utilizada hasta el momento, desafortunadamente sólo una pequeña fracción de los péptidos de una muestra son normalmente detectados, y solamente una determinada fracción de los mismos da lugar a fragmentaciones útiles. La estrategia Bottom-Up es además una aproximación subóptima para la caracterización y detección de determinadas PTMs e identificación de isoformas. Sin embargo, la proteómica Top-Down, proporciona un nivel de información del estado intacto de la proteína, que no se consigue con la proteómica Bottom-Up. No obstante, la separación mediante LC es más dificultosa, su análisis mediante MS y la interpretación de los resultados es más complejo, al mismo tiempo que requiere del uso de costosos instrumentos de MS de alta resolución y del desarrollo de nuevos algoritmos informáticos. Desafíos experimentales que en un futuro habrá que suplir, ya que la estrategia Top-Down proporciona un nivel de información del estado intacto de la proteína que no lo consigue la proteómica Bottom-Up. Una aproximación híbrida es la más adecuada en este momento, en la que tanto las estrategias Bottom-Up como Top-Down se integren y se complementen unas a las otras, para dar lugar a un entendimiento más comprensivo.

7.1.7 Técnicas experimentales y herramientas proteómica

Los estudios en proteómica se basan en el uso consecutivo de una serie de técnicas que suelen clasificarse en tres categorías: (I) herramientas para la separación de los componentes del proteoma; (II) herramientas para la identificación, caracterización y cuantificación de los componentes; y (III) técnicas para el almacenamiento, procesamiento e interpretación de los resultados obtenidos.

a) Separación de los componentes de un proteoma

La elección de una adecuada preparación de la muestra debe ser lo más representativa posible del correspondiente proteoma real, ya que de ella dependerá los trabajos posteriores, resultados y conclusiones (Lootspeich, 1999; Graves & Haysted, 2002). Uno de los principales obstáculos asociados al análisis del proteoma, es el amplio rango dinámico de concentraciones proteicas que podemos encontrarnos. Para solventar este problema, las proteínas más abundantes pueden ser eliminadas o la complejidad de la muestra puede ser reducida, mediante la utilización de distintas técnicas de fraccionamiento o enriquecimiento (Patterson, 2003; Garbis et al., 2005).

Las principales técnicas de separación de los componentes de un proteoma son dos: las técnicas electroforéticas y las técnicas cromatográficas. La diferencia principal entre genómica y proteómica, es que el genoma puede ser visto como una colección de genes cuya naturaleza es estática; es decir, no cambia entre célula y célula, mientras que el proteoma es una entidad cambiante, es una colección dinámica de proteínas que difieren de un individuo a otro, o de una célula a otra.. (Robles & Batista, 2003)

Uno de los mayores retos de análisis del proteoma es el fraccionamiento reproducible de estas mezclas complejas de proteínas al tiempo que conserva las relaciones cualitativas y cuantitativas. Actualmente, la electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones (2-D) es el único método que puede manejar esta tarea (Cotter et al. 1999; Görg et al. 2000), y por lo tanto ha adquirido especial importancia. Dado 2-D es capaz de resolver más de 1,800 proteínas en un solo gel (Choe y Lee 2000), es importante como la herramienta principal de la investigación proteómica donde múltiples proteínas deben estar separados para análisis en paralelo. Permite que cientos de miles de productos de los genes sean analizados simultáneamente, en combinación con sistemas asistidos por computadora para la evaluación de la amplia imagen, para una exhaustiva exanimación cualitativa y cuantitativa de proteomas, esta técnica de electroforesis permite la catalogación y la comparación de los datos entre los grupos de investigadores.

7.2 Electroforesis

7.2.1 Fundamento

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo, en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas

complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. La electroforesis es una técnica que ayuda en el estudio del movimiento de las biomoléculas con carga neta a través de un campo eléctrico. Su migración depende de la forma, tamaño, carga y composición química.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio y se ve expresada de la siguiente manera:

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm, su signo es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente por que se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoelectrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo. (Morales & Gallo, 2006)

7.3 Tipos de electroforesis

7.3.1 Electroforesis libre

El campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones (Fig. 6). Históricamente, es el origen de la electroforesis tal y como hoy la conocemos y fue desarrollada por Arne Tiselius en 1937. Actualmente está en desuso, ya que al ser un fluido el medio en el que se desarrolla, tiene poco poder de resolución. (Morales & Gallo, 2006)

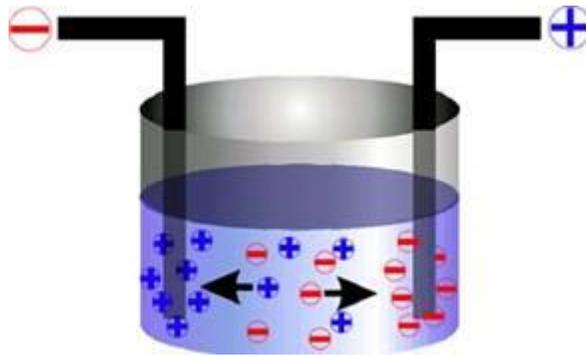


Figura 6 Electroforesis libre

7.3.2 Electroforesis zonal

Es una técnica en la que el desplazamiento de la proteína está limitado a un soporte sólido como el papel de filtro, el acetato de celulosa o más a menudo, un gel (fig. 7). Esto elimina en gran medida la mezcla por convección de la muestra que limita la resolución de la electroforesis de entorno móvil. Además en la movilidad zonal los componentes de la muestra migran como bandas discretas (zonas) por lo que solo se requieren pequeñas cantidades de material.(Morales & Gallo, 2006)

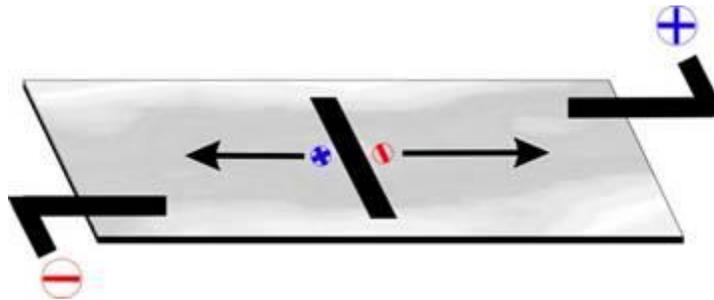


Figura 7 Electroforesis zonal

7.3.3 Electroforesis SDS-PAGE

El método más ampliamente utilizado para el análisis y caracterización de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en ingles). La matriz de poliacrilamida se forma mediante la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida, ocurriendo esto en presencia de un agente indicador (TEMED) y de un catalizador (ion persulfato). La poliacrilamida actúa como soporte inerte y de acuerdo con la concentración de los polímeros se puede obtener diferentes tamaños del poro, lo que da como consecuencia una migración de proteínas más pequeñas y un mayor rango de separación entre ellas. Las proteínas en un gel de poliacrilamida sometidas a la influencia de un campo eléctrico avanzan de acuerdo con su carga neta y al tamaño de su molécula. El equipo que se utiliza en la electroforesis de geles de poliacrilamida difiere del equipo utilizado en los

geles de agarosa. Para los geles PAGE se requiere de un equipo de electroforesis vertical que presenta dos reservorios separados para las soluciones de corrida, de un soporte para formar los geles, de separadores de cristales en donde se polimerizan los geles, y de “peines” que presentan un menor espesor que el que se utiliza en los geles de agarosa. (Catro, 2005)

Un punto importante en los sistemas electroforéticos en geles de poliacrilamida, es el sistema de buffers utilizado. De acuerdo con esto podemos clasificar a estos sistemas de 2 formas:

1. **Sistemas disociantes**, que permiten la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas y **sistemas no disociantes** que permiten el análisis electroforético de las proteínas en su forma nativa conservando su actividad biológica.
2. **Sistemas continuos**, en donde el gel, reservorios de electrodos y muestras, tienen buffers con igual pH y misma tensión iónica, y **sistemas discontinuos** donde el buffer utilizado en la formación del gel es diferente en cuanto a iones y pH, del buffer utilizado en los reservorios de los electrodos. En el sistema discontinuo la muestra pasa primero en un gel concentrador que se encuentra en la parte superior del gel separador, siendo esto ventajoso ya que la muestra es concentrada electroforéticamente en una banda delgada antes de que pase al gel separador, incrementando con esto la resolución de la electroforesis

Dependiendo del tipo de proteínas que se pretendan analizar, es el tipo de gel que se va a utilizar. Existen geles bajos en sales que se utilizan para analizar proteínas nativas, otros geles utilizan urea para analizar proteínas básicas y otros utilizan sustancias desnaturalizantes como los detergentes para disociar las proteínas en subunidades polipeptídicas. (Catro, 2005)

Existen diferentes tipos de sistemas de electroforesis en geles de poliacrilamida que son ampliamente utilizados:

1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-desnaturalizantes (PAGE-SDS) donde las muestras son desnaturalizadas en presencia de detergentes SDS y tanto el gel como el buffer de corrida contienen SDS. Las proteínas se separan en este sistema de acuerdo a su peso molecular.
2. Geles en gradiente, como su nombre lo indica, el gel está formado en un gradiente de concentración de acrilamida-bisacrilamida, lo cual optimiza la separación de proteínas que tienen pesos moleculares muy cercanos.
3. Isoelectroenfoque (IEF por sus siglas en inglés), en este sistema las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico y se lleva a cabo en ausencia de detergentes.

4. Geles bidimensionales, donde las proteínas son inicialmente separadas por isoelectroenfoque y después por PAGE-SDS por lo tanto la separación de las proteínas es por su punto isoeléctrico y por su peso molecular.

De los sistemas de electroforesis en poliacrilamida, el más utilizado es el PAGE-SDS en sistema de buffer discontinuo que fue descrito originalmente por Laemmli. El SDS es un detergente anionico que se une fuertemente a las proteínas y las desnaturaliza. En presencia de un exceso de SDS se une aproximadamente 1.4 gr de SDS por cada gramo de proteína. El alto nivel de unión del detergente a las proteínas les confiere una carga negativa, por lo que el complejo proteína-SDS se desplaza hacia el electrodo positivo (ánodo). Bajo estas condiciones la velocidad de desplazamiento de las proteínas es inversamente proporcional al peso molecular de las mismas, por lo que el PAGE-SDS resulta un método conveniente para determinar el peso molecular de una proteína desconocida. (Catro, 2005)

El peso molecular de una proteína se puede calcular en este sistema mediante el uso de marcadores de peso molecular (proteínas de peso molecular conocido), esto se realiza mediante una curva de calibración en donde se grafica la movilidad electroforética (cm) de cada una de las proteínas estándar vs el logaritmo de su peso molecular (Catro, 2005).

7.4 Preparación del soporte

El soporte se prepara a partir del monómero acrilamida (fig. 8) que forma largas cadenas lineales, con abundantes grupos polares que las hace solubles en medios acuosos. Al no estar las cadenas unidas entre sí formarían un gel sin consistencia mecánica y totalmente inmanejable, para evitar esto, se utiliza otro monómero, la N, N'-metilen-bisacrilamida que forma parte de dos cadenas que quedan así unidas covalentemente.

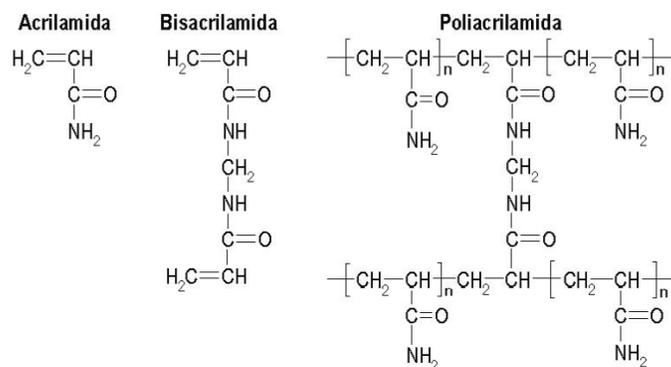


Figura 8 Estructura de la acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida

La polimerización es inducida por radicales libres derivados de la descomposición química del persulfato de amonio o de la foto descomposición de la riboflavina en presencia de trazas de O₂. En cualquiera de ambos casos se suele agregar a la mezcla N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED) un estabilizador de radicales libres. Las propiedades físicas del gel y su tamaño de poro se controlan por la proporción de poliacrilamida en el gel y su grado de entrecruzamiento. Las concentraciones de poliacrilamida más utilizadas varían entre el 3 y 15 % mientras que la cantidad de TEMED se fija en un 5% del total de acrilamida. (J. Sambrook, 1989)

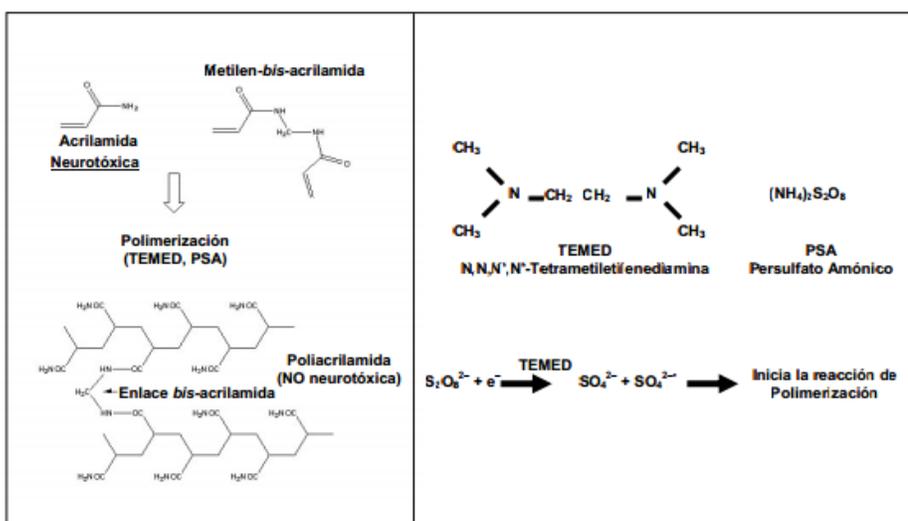


Figura 9 Polimerización del soporte

7.5 Preparación de la muestra

Para aprovechar las ventajas de la alta resolución de 2-DE, las proteínas de la muestra tienen que ser desnaturalizadas, desdobladas, reducidas y solubilizadas para lograr la interrupción completa de interacciones moleculares y para asegurar que cada punto represente un polipéptido individual. Los principales problemas relacionados con la visualización de proteínas a partir de células totales o extractos de tejidos se encuentran en el alto rango dinámico de la abundancia de proteínas y la diversidad de proteínas con respecto a peso molecular, pI y solubilidad. Aunque un procedimiento de un solo paso para la extracción de la proteína sería altamente deseable con respecto a sencillez y reproducibilidad, no existe un método único de preparación de la muestra que se puede aplicar universalmente a todos los tipos de muestras analizadas por 2-DE.

Las muestras que contienen urea no deben ser calentadas, para evitar heterogeneidades de carga causados por carbamilación de las proteínas por isocianato formados en la descomposición de la urea. Los tres pasos fundamentales en preparación de la muestra son la ruptura celular, la inactivación o la eliminación de las sustancias que interfieren, y la solubilización de las proteínas.

Durante o después de la lisis celular, interfiriendo compuestos tales como enzimas proteolíticas, sales, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, fenoles vegetales y/o muy abundantes proteínas tienen que ser eliminados o inactivados. Los dos parámetros más importantes son la sal y proteólisis. (Görg, Weiss, & Dunn, 2004)

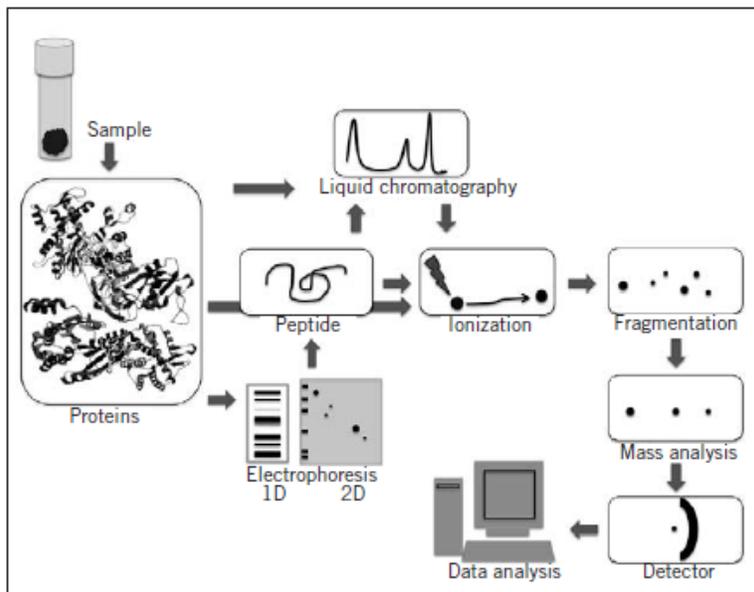


Figura 10 Diferentes metodologías pueden combinarse en estudios proteómicos. Metodologías más comúnmente utilizadas que implican la extracción de proteínas de la muestra, la separación por uno-(1-D) o de dos dimensiones (2-D) de electroforesis y/o cromatografía líquida, la ionización, la fragmentación, el péptido el análisis y la detección y el análisis de datos.

7.6 Electroforesis en dos dimensiones

7.6.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Punto isoeléctrico (pI)

Las diferencias en las proteínas como su pI son la base de la separación por IEF. El pI se define como el pH en el que una proteína no migrará en un campo eléctrico y se determina por el número y tipos de grupos cargados en una proteína. Las proteínas son moléculas anfóteras. Como tales, pueden llevar la carga neta a positivo, negativo o cero dependiendo del pH de su entorno local. Para cada proteína hay un pH específico en el que su carga neta

es cero, lo que es su pI. Las proteínas muestran una considerable variación en el pI, aunque los valores de pI por lo general caen en el rango de pH de 3-12, con la mayoría cayendo entre pH 4 y pH 7. Una proteína es positivamente cargada en la solución a valores de pH por debajo de su pI y negativamente cargada a valores de pH por encima de su pI.

IEF

Cuando una proteína se coloca en un medio con un gradiente de pH y sometido a un campo eléctrico, será inicialmente movido hacia el electrodo con carga opuesta. Durante la migración a través del gradiente de pH, la proteína puede tomar protones o bien, perderlos. Como se migra, su carga neta y la movilidad disminuirán y la proteína se ralentizará. Con el tiempo, la proteína llegará en el punto en el gradiente de pH igual a su pI, ahí siendo sin carga, se detendrá la migración (Figura 11). Si esta proteína debería ocurrir para difundir a una región de menor pH, lo hará convertido protonada y se ven obligados de nuevo hacia el cátodo por el campo eléctrico. Si, por otro lado, se difunde en una región de pH mayor que su pI, la proteína se convertirá cargado negativamente y será impulsado hacia el ánodo. En esta manera, las proteínas se condensan o se centran, en bandas de agudos en el gradiente de pH en sus valores de pI característicos individuales.

Enfocándose en un mecanismo de estado estacionario con respecto al pH, las proteínas se acercan a sus respectivos valores de PI a ritmos diferentes pero siguen siendo relativamente fijas en los valores de pH de los períodos extendidos, por el contrario, las proteínas en la electroforesis convencional continúan moviéndose a través del medio, hasta que el campo eléctrico es eliminado. Por otra parte, en el IEF, las proteínas migran a su estado de posición estacionario desde cualquier parte del sistema. (Garfin 1995).

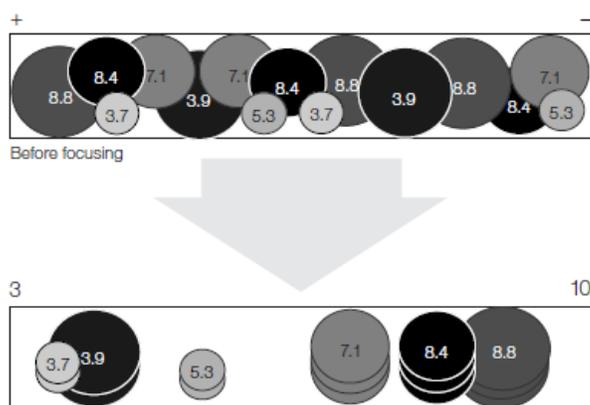


Figura 11 Una mezcla de proteínas se resuelve en una tira de IPG de pH 3-10 de acuerdo con su pI de cada proteína e independientemente de su tamaño, como se describe en la sección de IEF.

7.6.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE

La separación de la proteína por peso molecular (PM)

Segunda dimensión es la separación por la masa de proteínas, o PM, utilizando SDS-PAGE. Las proteínas resueltas en tiras IPG en la primera dimensión se aplican a los geles de segunda dimensión y separados por PM perpendicularmente a la primera dimensión.

Los poros del gel de la segunda dimensión se forman de acuerdo al tamaño de las proteínas, esencialmente en proporción a su masa. El efecto neto es que las proteínas migran como elipsoides con una carga uniforme negativa con movilidad relacionada logarítmicamente a la masa (Garfin 1995). Ver Figura 12.

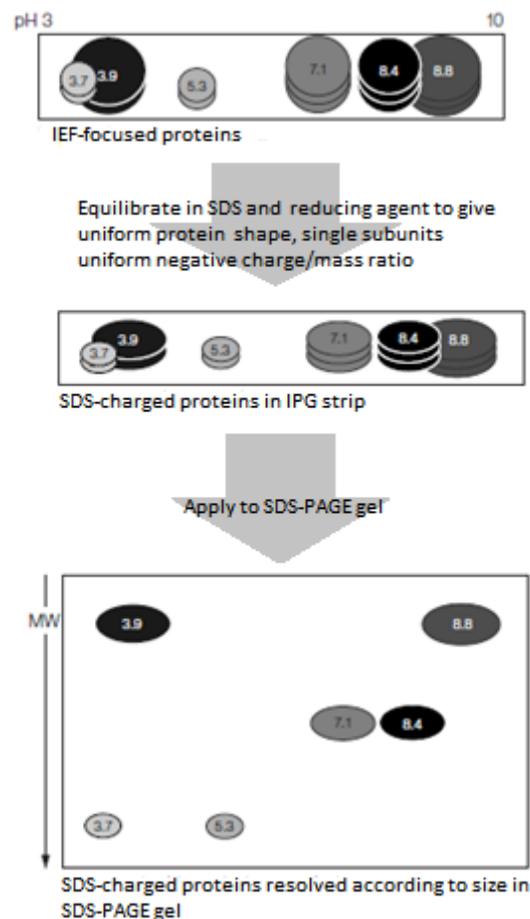


Figura 12 Diagrama esquemático que muestra la separación de proteínas por SDS-PAGE después de la separación por IEF.

Para la estandarización de la técnica se utilizaron muestras biológicas humanas tales como saliva y orina.

7.7 Biofluidos

7.7.1 Saliva

La saliva es un material biológico bien estudiado por enfoques proteómicos (Barbosa et al., 2012). La cavidad oral es responsable de la entrada de sólidos, líquidos y aire. También está involucrada en procesos fisiológicos relevantes como la masticación, la digestión temprana de la comida y emisión de sonidos. La saliva es el fluido corporal responsable de la protección de la cavidad oral (Castagnola et al., 2011).

La mayor parte de la saliva del humano es producida por tres pares de glándulas salivales principales: las parótidas, las submaxilares y las sublinguales, aunque también contribuyen en menor proporción numerosas glándulas salivales pequeñas que revisten la mucosa bucal. La saliva no se forma por ultrafiltración pasiva del plasma, si no por un proceso activo que consume energía (Fuentes Arderiu X., 1998). La saliva alberga proteínas, hormonas, lípidos, pequeñas moléculas (tales como la urea), y electrolitos (calcio, bicarbonato, fosfato, y fluoruro) (Barbosa et al., 2012), pero en una concentración mucho menor que en plasma. Las proteínas más abundantes de la saliva son enzimas y glucoproteínas específicas.

La saliva humana es un atractivo biofluido, debido a que su colección es no invasiva, y contiene una gran variedad de proteínas, muchas de las cuales han demostrado ser de carácter informativo para la detección temprana de enfermedades sistémicas por vía oral. (Kaufman & Lamster, 2002)

La saliva es hipo-osmótica con respecto al plasma, ya que contiene muchas sustancias inorgánicas y orgánicas, así como toda clase de macromoléculas conocidas (Castagnola et al., 2011).

7.7.2 Orina

La orina es el resultado de los procesos de filtración glomerular, reabsorción y secreción tubulares, que tienen lugar en el riñón. Por la orina se elimina una serie de sustancias procedentes tanto del catabolismo endógeno como del medio externo.

- Componentes normales: urea, creatinina, urobilinogeno y urobilina, pequeñas cantidades de proteínas, aminoácidos, iones y escasa celularidad (hematíes, leucocitos y células de vías urinarias de forma aislada)

- Componentes anormales o patológicos: proteínas, hematíes y leucocitos en mayores proporciones, bilirrubina, glucosa, cuerpos cetónicos, cilindros, cristales y gérmenes. (Pérez, 2009)

Entre los constituyentes orgánicos de la orina ocupan un primer plano los compuestos nitrogenados como por ejemplo la urea que se sintetiza predominantemente en el hígado y la degradación de las bases pirimidínicas producen algo de urea. Dentro de los constituyentes inorgánicos se encuentran sobre todo cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y NH_4 y los aniones Cl^- , SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} . Considerando en conjunto Na^+ y el Cl^- representan aproximadamente 2/3 de todos los electrolitos de la orina final (Rohm, 2004).

Las muestras de orina son uno de los fluidos biológicos utilizados en proteómica clínica, ya que pueden ser obtenidos en un modo no invasivo y en grandes cantidades.

La orina es una matriz biológica de fácil acceso para identificar nuevos biomarcadores. El proteoma urinaria es muy complejo, contiene 1.000 de proteínas y péptidos que se derivan de los procesos de filtración / secreción / reabsorción en el riñón. (Schlatzer et al., 2012)

La investigación en orina en el diagnóstico clínico es seguida a la del plasma. La orina es generada como resultado de la filtración del plasma por glomérulos en los riñones, manteniendo la mayoría de las proteínas. Los cambios en el proteoma urinario pueden reflejar cambios relacionados con la enfermedad en el tejido dañado, no sólo en relación con las enfermedades urogenitales, sino también con algunas enfermedades sistémicas (Rodríguez et al, 2014).

Existe un protocolo internacional de recogida de orina creado como resultado de consenso conjunto de Proteómica urinaria europea y del riñón (EuroKUP) y el Riñón humano y el proyecto proteoma orina (<http://eurokup.org>), este protocolo nos sirvió para tener una guía de cómo hacer el procedimiento adecuado para la toma de muestra.

8 Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

8.2 Preparación de la muestra

En cuanto a la estandarización del primer paso de la electroforesis en dos dimensiones que es la preparación de la muestra, se realizó con biofluidos de orina y saliva humana. A continuación se describe la metodología utilizada para cada uno de ellos.

8.2.1 Muestras de orina

La toma de muestra se realizó tomando en cuenta el protocolo Procedures for urine sample processing (<http://eurokup.org/node/129>) con algunas modificaciones.

El procesamiento de las muestras de orina realizado de la siguiente manera permite que sean utilizadas para varias aplicaciones proteómicas, incluyendo 1D y 2D-PAGE y perfiles SELDI/MALDI.

Primer ensayo	Segundo ensayo
Toma de muestra	
<p>Para la recolecta de muestra de orina se utilizó un vaso copro estéril graduado hecho de polipropileno, al recipiente estéril en donde se colectó la muestra se añadió inhibidor de proteasas para evitar que las proteínas de la orina fueran degradadas. La muestra se tomó por la mañana de la siguiente manera:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Se pidió a la voluntaria lavar bien el área entre los labios de la vagina y que dejara caer en el inodoro una pequeña cantidad de orina antes de tomar la muestra (esto elimina de la uretra elementos contaminantes), se recogieron 50 ml de muestra.2. Se dieron indicaciones que durante el trayecto para entregar la muestra se transportara en refrigeración.3. Al momento de recibir la muestra se rotulo el recipiente con nombre, edad y fecha, y se procedió a la preparación de la muestra.	<p>Se tomó la muestra de orina diurna y vespertina en un vaso de copro estéril con 50 µl respectivamente, de una mezcla de inhibidores de proteínas siguiendo las concentraciones que indica el proveedor (mini complete). Los vasos estériles con mini complete se mantuvieron en congelación hasta el momento de la toma de muestra.</p> <p>Se colectaron 15 ml de orina y se dieron las mismas indicaciones de los pasos 1, 2 y 3 del primer ensayo.</p>
Preparación de la muestra	
<ol style="list-style-type: none">1. Se colocaron 40 ml de muestra en un tubo y se utilizó una centrifuga Beckman modelo J-21C, se centrifugo a 1000 x g durante 10 minutos.2. Posteriormente se realizó una ultrafiltración con una columna amicon (corte 10, 000 Da) millipore a 4 000 x g por 10	<ol style="list-style-type: none">1. Se colocaron los 15 ml de orina recolectada en un tubo y se centrifugo a 1000 x g durante 10 minutos con una beckman modelo J-21C.2. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 15 µl de nucleasa mix con el fin de eliminar material genético presente en la muestra. Se dejó secar

minutos, se desechó el filtrado y se conservó el concentrado.

3. Al concentrado se le agrego 5 µl de RNasa y se dejó actuar durante 1 hora a temperatura ambiente, esto con el fin de eliminar material genético (ARN Y ADN).
4. Se precipitaron las proteínas con una mezcla fría de acetona y metanol (8:1) para la eliminación de lípidos y sales. Se almacenó a -20°C durante la noche.
5. El precipitado se sedimentó por centrifugación a 4 000 x g durante 15 minutos y se procedió a lavar con 1 ml de acetona seguido de metanol y se dejó secar al aire libre.
6. El sedimento resultante se solubilizo con 1000 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% TDT, 15 Mm Tris)

a temperatura ambiente durante una hora.

3. Se realizó la precipitación de proteínas con una mezcla fría de acetona-metanol a una concentración 8:1 y se dejó a -20 °C durante la noche.
4. Se realizó una segunda centrifugación a 4 000 x g durante 15 minutos, el precipitado se lavó con 1 ml de acetona seguido de metanol y se dejó secar al aire libre.
5. El botón resultante se solubilizo con 200 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% TDT, 15 Mm Tris)

Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La concentración de proteínas se midió usando un estuche comercial, el cual es una modificación del método Bradford (Bio-rad).

Para la preparación de la curva estándar se utilizó como referencia la proteína de suero bovino (BSA) con un peso molecular conocido de 66.385 kDa. La curva estándar se realizó colocando las siguientes cantidades en los tubos correspondientes, cada lectura se hizo por duplicado:

Tabla 1 Preparación de la curva patrón ensayo 1 y 2

µl BSA (1 mg/µl)	µl NaCl 0.15 M	µl Rx Bradford (azul Coomassie)	Absorbancia 595 nm
-	200	800	
2.5	197.5	800	
5	195	800	
7.5	192.5	800	
10	190	800	

Cada tubo se homogenizó colocándolo en el vortex durante 3 segundos, se dejó reposar el reactivo de Bradford por un lapso de 5 minutos y se procedió a la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nanómetros. La curva se reporta en la gráfica 1

Para la preparación de cada tubo con muestra de orina se hizo de la siguiente manera, del mismo modo todas las muestras se realizaron por duplicado.

Tabla 2 Preparación para la muestra de orina. Ensayo 1

µl Orina	µl NaCl 0.15 M	µl Rx Bradford	Absorbancia 595 nm
-	200	800	
10	190	800	
15	185	800	
20	180	800	

Tabla 3 Preparación para las muestras de orina vespertina y diurna. Ensayo 2

µl Orina- día/noche	µl NaCl 0.15 M	µl Rx Bradford	Absorbancia 595 nm
-	200	800	
1	199	800	
3	197	800	
5	195	800	

Cada tubo con los reactivos se colocó en el vortex durante 3 segundos para homogenizar la muestra, se dejó reposar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nanómetros. Ver gráficas 2 y 3.

8.2.2 Muestras de saliva

La recolección de saliva se llevó a cabo en micro tubos estériles con capacidad de 1.5 ml y se le agregaron 20 µl de mini complete a una concentración de 10 x (cóctel inhibidor de proteasas). Se hizo la recolección de las muestras por la noche y en la mañana del día siguiente por lo que se le pidió al voluntario mantener los tubos con mini complete en el congelador hasta la hora de la recolección de la saliva, al voluntario se le dieron las siguientes indicaciones para hacer una correcta colección de muestra:

Por lo menos dos horas antes de la recolección de muestra se deberá hacer su limpieza dental y con el estómago vacío sin haber tomado alguna bebida o ingerido cualquier tipo de alimento, incluyendo goma de mascar o caramelos.

Se recogió la saliva no estimulada en los micro tubos con el cóctel inhibidor de proteasas y se transportó al laboratorio en congelación.

Preparación de la muestra

Se centrifugaron las muestras de saliva recogidas durante la noche y mañana a 14 000 x g por 30 minutos, posteriormente las proteínas resultantes del sobrenadante se precipitaron con una mezcla fría de acetona-metanol (8:1) y se incubaron a 0°C durante una hora, se procedió a una segunda centrifugación a 14 000 x g durante 30 minutos, se decantó el líquido y se lavaron los sedimentos tres veces con acetona y se dejó secar al aire libre. Ya seco el sedimento se solubilizo en 100 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% TDT, 15 Mm Tris)

Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La curva estándar para la cuantificación de proteínas en muestras de saliva fue la misma que para muestras de orina ver tabla 1.

Para la preparación de cada tubo con muestras de saliva se hizo de la siguiente manera, del mismo modo todas las muestras se realizaron por duplicado.

Tabla 4 Preparación para las muestras de saliva día y noche.

µl Saliva- día/noche	µl NaCl 0.15 M	µl Rx Bradford	Absorbancia 595 nm
-	200	800	
2	199	800	
4	197	800	
6	195	800	

8.3 Electroforesis

Por cada preparación de muestra se realizó la electroforesis convencional vertical con el equipo Bio-rad, para verificar la presencia de las proteínas, se corrió un gel de poliacrilamida por cada muestra.

Preparación del soporte

El gel separador y el concentrador se prepararon de acuerdo a las cantidades mencionadas en el manual de laboratorio molecular cloninig tomo III, el gel separador se utilizó al 10%.

8.4 Electroforesis en dos dimensiones

Primera dimensión; Isoelectroenfoque (IEF)

Para la primera etapa de la electroforesis bidimensional, IEF se utilizaron tiras IPG Bio-rad de 7 cm con un pH dentro del rango de 3 a 10.

Se rehidrataron dos tiras en un tubo con tapa hermética con buffer (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 15 mM tris) durante 4 horas. Se cambió el buffer de rehidratación a buffer con muestra de saliva (saliva nocturna, anfolitos 2%, mini complete, buffer) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante toda la noche con movimiento.

Posteriormente se retiraron las tiras del buffer con muestra y se colocaron en 500 μ l del buffer I (50 mM tris, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 1% DTT) la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 10 minutos tras lo que se procedió al lavado de las tiras con agua desionizada. La segunda incubación se realizó en 500 μ l del buffer II (50 mM tris, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 5% de iodoacetamida) durante otros 10 minutos en movimiento constante a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de rehidratación, se sacaron las tiras y se colocaron en la cámara de electroforesis bidimensional cleaver scientific ltd, se conectó a la fuente de poder y se empezó con el corrimiento de las tiras durante seis horas con un voltaje diferente, dos horas con un voltaje de 150 v y cuatro horas a 300 v.

Segunda dimensión; SDS-PAGE

Al finalizar la primera dimensión (IEF) se retiraron las tiras y se colocaron en la cámara de electroforesis vertical Bio-rad, se preparó el gel separador de poliacrilamida al 10% y en la parte superior se colocaron las tiras IPG y se aplicó un voltaje de 200 v durante 2 horas.

Tinción del gel

La tinción del gel se llevó a cabo con el reactivo azul de coomassie, con cantidad suficiente para cubrir el gel y se colocó en una parrilla con movimiento durante un lapso de 30 minutos para posteriormente cambiar la solución de coomassie por agua y desteñirlo con calor durante 5 minutos, esta acción se repitió hasta que el gel se desteñiera completamente en donde no se encontraban las bandas de proteínas. En la figura 13 se observa el esquema de la técnica de electroforesis en dos dimensiones.

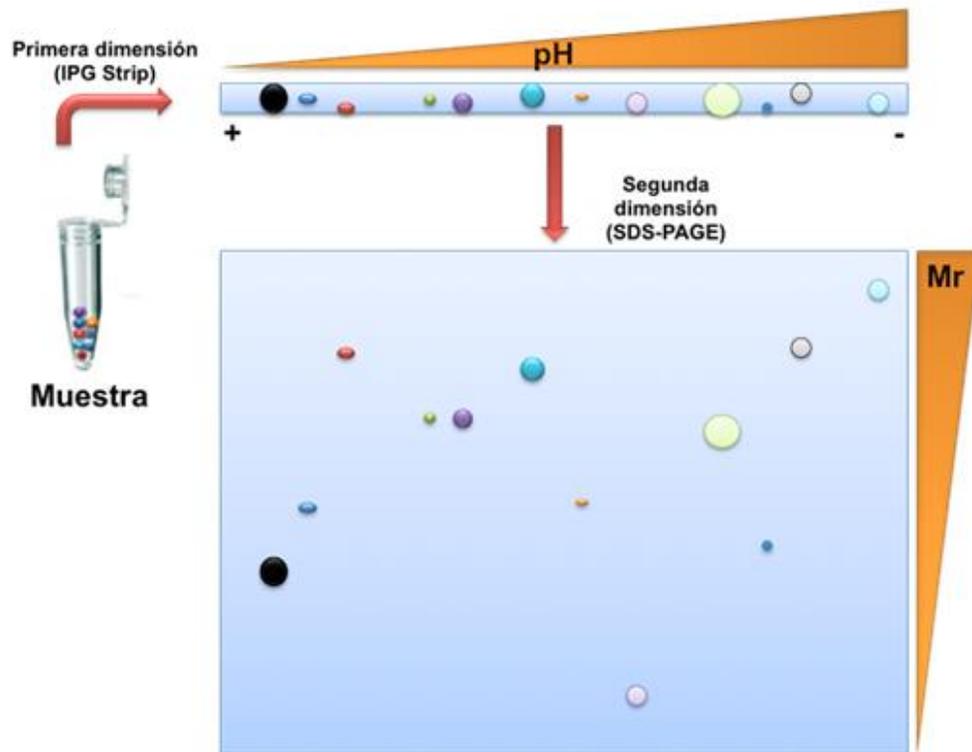


Figura 13 Esquema de electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE)

9 Resultados

El método Bradford utilizado involucra la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 nm a 595 nm y se monitorea midiendo el incremento en la absorción a 595 nm.

El colorante azul de Coomassie se une principalmente a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina, como se observa en la figura 14.

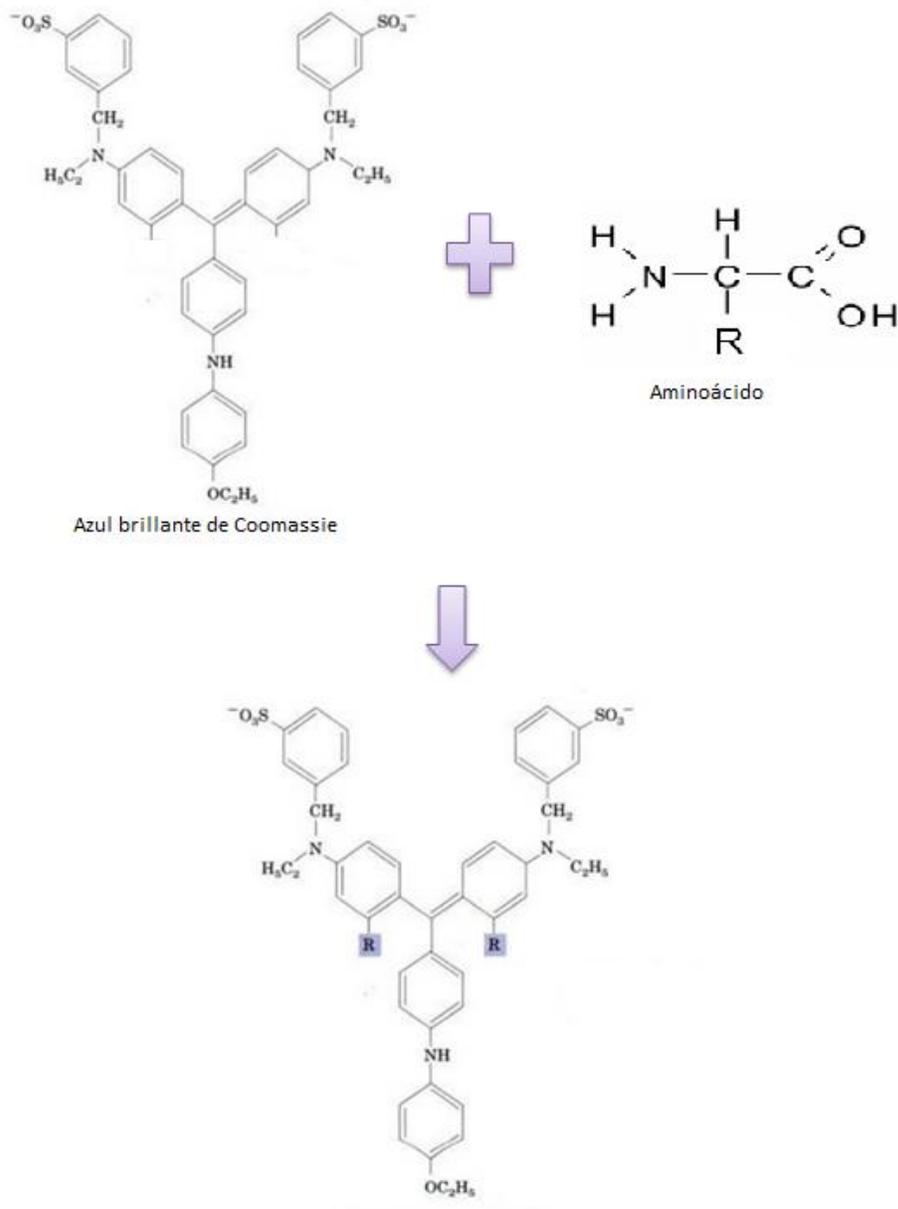


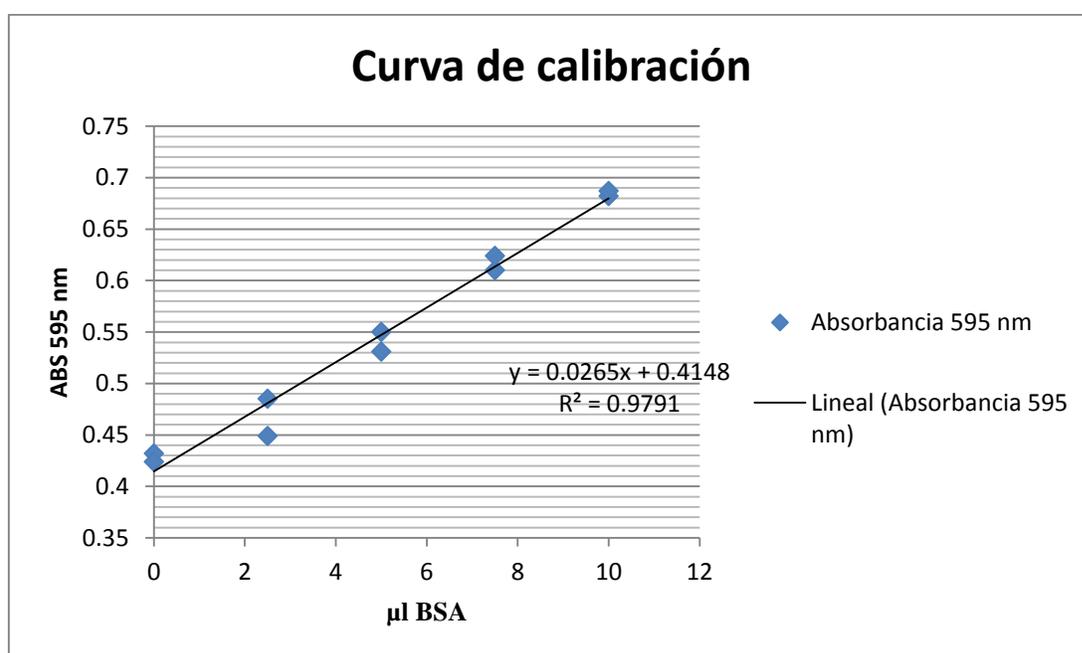
Figura 14 Unión del colorante azul de Coomassie con aminoácidos.

La estimación de los pesos moleculares de las bandas observadas mediante la electroforesis se realizó conociendo el peso molecular de una proteína, tomando como referencia, la fracción VII de Albumina de suero bovino® (BSA) marca sigma, con un peso molecular de 66.382 kDa, se midió la distancia recorrida por el azul de bromofenol (colorante de rastreo) y de las muestras para hacer una estimación de pesos de las bandas encontradas como se muestra en la tabla.

Tabla 5 Distancias recorridas y pesos estimados

Carril	Distancia recorrida	Peso conocido
BSA	5 cm	66.382 kDa
		Peso estimado
	4.7 cm	70 kDa
	5.6 cm	59 kDa
	8.2 cm	40 kDa

A continuación se muestra la gráfica de la curva de calibración.



Gráfica 1 Curva de calibración elaborada a partir de datos obtenidos mediante el método Bradford

Tabla 6 Concentración de proteína BSA

µl BSA	ABS 595 nm	Concentración µg/µl	Concentración promedio µg/µl	Concentración µg/µl
2.5	0.449	1.2906	1.9698	0.7879
	0.485	2.6491		
5	0.550	5.1019	4.7434	0.9487
	0.531	4.3849		
7.5	0.610	7.8443	7.6302	1.0174
	0.624	7.8943		
10	0.682	10.0830	10.1774	1.0177
	0.687	10.2717		

Resultados de Orina humana.

Ensayo 1

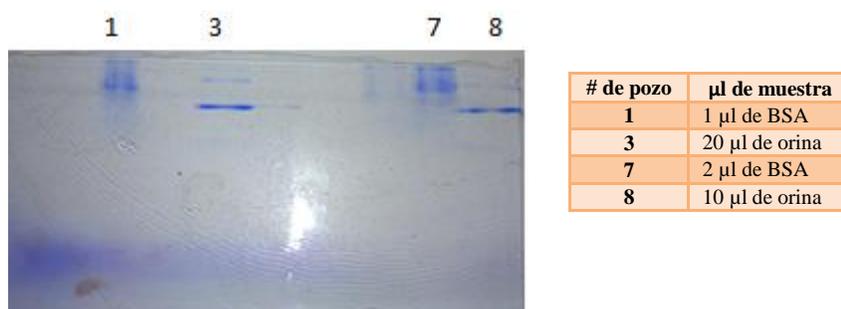


Figura 14 Electroforesis del extracto total de proteínas contenidas en orina humana.

En la figura 15 se observan los carriles 3 y 8 cargados con muestra de orina mostrando una banda bien marcada con un peso de 40 kDa respectivamente, mientras que en los carriles 1 y 7 se cargó una proteína estándar BSA con un peso molecular conocido de 66.382 kDa.

Tabla 7 Concentración de proteína en orina

µl orina	ABS 595 nm	Concentración de proteína µg/µl	Concentración promedio µg/µl	Concentración µg/µl
10	0.480	9.7161	7.8452	0.7845
	0.422	5.9742		
15	0.591	16.8774	14.7161	0.9811
	0.524	12.5548		
20	0.650	20.6839	21.2323	1.0616
	0.667	21.7806		

Ensayo 2

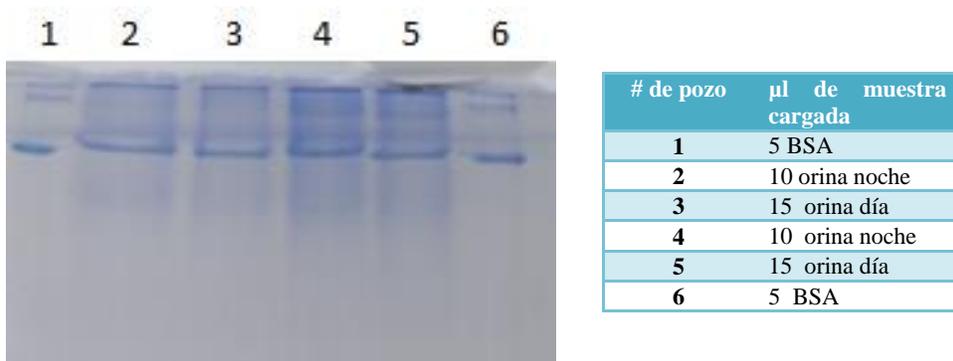


Figura 15 Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto total de proteínas en orina humana.

En la figura 16 se observa el extracto de proteínas contenidas en orina humana recolectadas durante el día (carriles 3 y 5) y noche (2 y 4). La electroforesis separó una banda prominente en cada carril de 70 kDa aproximadamente. Como proteína estándar se utilizó BSA en los carriles 1 y 6 con un peso molecular de 66.382 kDa.

Tabla 8 Concentración de proteínas en muestras de orina-día

μl orina-día	ABS 595 nm	Concentración de proteína μg/μl	Concentración promedio μg/μl	Concentración μg/μl
1	0.527	3.3161	2.9290	2.9290
	0.503	2.5419		
3	0.534	3.5419	3.1548	2.3419
	0.510	2.7677		
5	0.617	6.2194	6.6871	1.3374
	0.646	7.1548		

Tabla 9 Concentración de proteína en muestras de orina-noche

μl orina-noche	ABS 595 nm	Concentración de proteína μg/μl	Concentración promedio μg/μl	Concentración μg/μl
1	0.533	3.5097	3.9935	3.9935
	0.563	4.4774		
3	0.644	7.0903	7.0258	2.3419
	0.640	6.9613		
5	0.756	10.7032	11.0581	2.2116
	0.778	11.4129		

En las tablas 8 y 9 se puede observar las concentraciones del extracto de proteínas contenidas en las diferentes cantidades analizadas de las muestras de orina tomadas durante el día con un promedio de 2.2028 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y por la noche 2.849 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se observa una mejor resolución del gel en el ensayo uno debido a la variante de la utilización de una columna amicon que ayudo a eliminar las sales.

Resultados en saliva

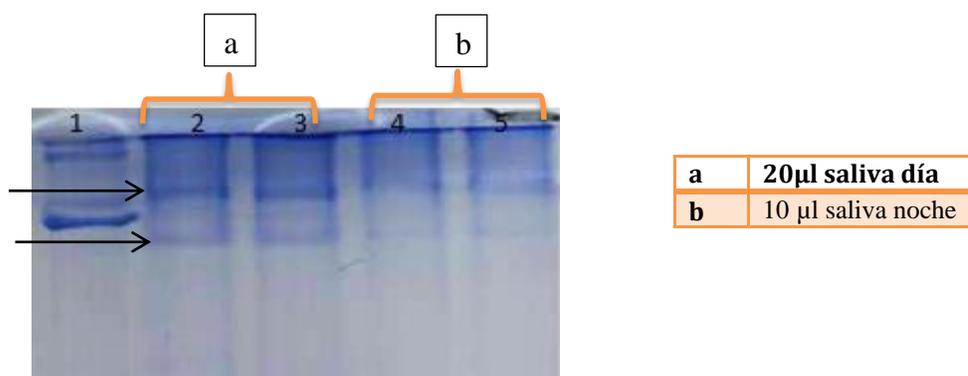


Figura 16 Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto total de saliva humana.

En la figura 17 Se observa el extracto de proteínas contenidas en saliva humana recolectadas durante el día (carriles 2 y 4) y noche (carriles 3 y 5).

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % separó 2 bandas prominentes de 59 y 70 kDa aproximadamente. El carril 1 muestra un estándar de BSA con un peso molecular de 66.382 kDa

Tabla 10 Concentración de proteína en muestras de saliva-día

μl saliva-día	ABS 595 nm	Concentración de proteína $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Concentración promedio $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2	0.502	2.492	2.592	1.296
	0.507	2.692		
4	0.599	6.372	6.292	1.573
	0.595	6.313		
6	0.665	9.012	9.372	1.562
	0.683	9.732		

Tabla 11 Concentración de proteína en muestras de saliva-noche

µl saliva-noche	ABS 595 nm	Concentración de proteína µg/µl	Concentración promedio µg/µl	Concentración µg/µl
2	0.488	1.932	2.212	1.106
	0.502	2.492		
4	0.573	5.332	4.852	1.213
	0.595	6.313		
6	0.663	8.932	7.852	1.3087
	0.609	6.772		

En las tablas 11 y 12 se muestran las concentraciones de proteínas obtenidas en muestras de saliva día de 1.477 µg/µl y en saliva noche 1.2092 no habiendo una diferencia significativa.

Se hizo una prueba para controlar el pH de la muestra agregando NaOH y así obtener una mejor resolución del gel sin embargo no se obtuvieron resultados favorables ya que se observó la formación de un precipitado.

Electroforesis en dos dimensiones

Debido a que el equipo con que se realizó el corrimiento de la electroforesis bidimensional no cuenta con las características de un alto voltaje al momento de la resolución del gel no se pudo observar nada ya que como se mencionó en la metodología se usó un voltaje máximo de 300 v, cuando en bibliografía reportada los voltajes que aplican van de 3,500 v a 80,000 v.

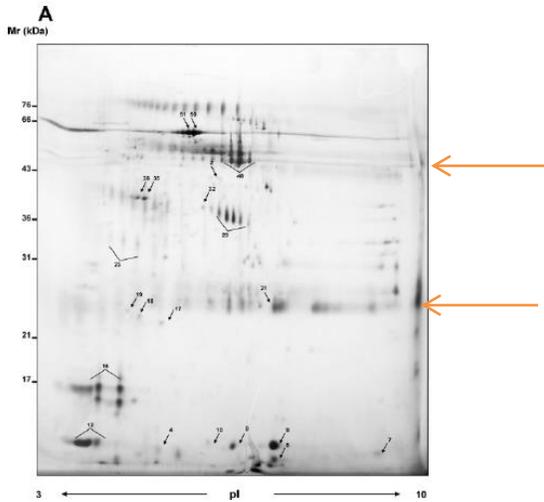


Figura 17 Electroforesis en 2D-PAGE. Prototipo del análisis de saliva humana

Comparando bibliográficamente el gel del extracto total de proteínas en saliva humana (figura 16) con el gel de la figura 17 se puede observar dos bandas prominentes (señaladas con las flechas) que se asemejan con el resultado del gel en dos dimensiones del análisis de la saliva humana reportado en el artículo realizado por Giusti et al., 2007 titulado “Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases – the example of Sjögren’s síndrome” desarrollado en la universidad de Pisa, Italia, en donde detectaron aproximadamente 200 manchas de proteínas, se obtuvo una buena resolución para los grupos de proteínas salivales representativas, por ejemplo la albúmina, la α -amilasa, la actina, anhidrasa carbonato VI, la proteína precursora de prolactina inducible (PIP), con ello podemos esperar encontrar el conjunto de proteínas expresadas en la imagen del artículo en nuestra muestra de saliva humana.

10 Conclusiones

El presente estudio se planteó con la finalidad de poder utilizar biofluidos humanos para la identificación de proteínas mediante la técnica de electroforesis bidimensional como herramienta de investigación en la proteómica.

Por lo que se puede concluir que los procedimientos experimentales utilizados en dicho trabajo dieron resultados satisfactorios ya que se eliminaron los componentes que hacían interferencia en la resolución del gel en el caso de la orina las sales, urea sin embargo en saliva aún se deben implementar procedimientos para neutralizar el pH, Considero que el tiempo y el costo son factores primordiales para que el trabajo no se concluyera hasta una estandarización adecuada y así las muestras puedan ser analizadas mediante la electroforesis 2D-PAGE óptimamente.

Dichos procedimientos formaran parte de la base analítica del laboratorio de Proteómica de Ecosur, el cual aplicará el trabajo que desarrollé en el campo de la proteómica, que servirá para identificar biomarcadores de distintas enfermedades como cáncer, desnutrición, preeclampsia, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, trasplante de órganos y estudios farmacodinámicos, entre otras, que ayuden a prevenir y a diagnosticar diversas enfermedades.

11 Recomendaciones

- ❖ Trabajar en un área completamente esterilizada al igual que los materiales a utilizar.
- ❖ Controlar el pH de la saliva de tal manera que en la resolución del gel se observen las bandas bien definidas
- ❖ Trabajar con cubre bocas y guantes durante la manipulación de las muestra y reactivos.

12 Bibliografía

Barbosa E. B., Vidotto A., Polachini G. M., Henrique T., Marqui A. B., and Helena T. E. 2012. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Revista Da Associação Médica Brasileira (English Edition)*, 58(3), 366–375.

Bogdanov B. and Smith R.D. 2005. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrum. Rev.* 24: 168-200.

Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M. T., and Messana, I. 2011. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 409–18.

Catro, J. Z. 2005. *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. Merida, México: Universidad autónoma de Yucatan.

Cotter R.J. 1999. The new time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71: 445A-451A.

Daniela, I., and Gallo, E. 2006. *Plataformas de Proteómica*

Debmalya Barh, V. Z. 2013. *Applications in biomedical, agricultural and environmental sciences*. CRC Press Taylor and Francis group.

Farrell P. H. O. 2010. *NIH Public Access*, 250(10), 4007–4021.

Fuentes M. J. 1998. *Bioquímica clínica y patología molecular*. España: Reverte

Garbis S., Lubec G., and Fountoulakis M. 2005. Limitations of current proteomics technologies. *J. Chromatograph. A* 1077: 1-18.

Graves P.R., and Haystead T.A. 2002. *Molecular biologist's guide to proteomics*. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 66: 39-63.

Giusti L., Baldini C., Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S. and Lucacchini A. 2007. Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases- the example of Sjögren's syndrome. *Proteomics*. 1634-1643.

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., and Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.

Görg A., Weiss, W., and Dunn, M. J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–85.

Han X., Jin M., Breuker K., and McLafferty F.W. 2006. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* 314: 109-112

Horgan R. P., Clancy O. H., Myers J. E., and Baker, P. N. 2009. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 116(2), 173–81.

<http://cienciasomicas.wordpress.com/2011/05/12/hello-world/>

<http://eurokup.org>

Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., and Cooks R.G. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40: 430-443.

J. Sambrook, E. F. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

Kaufman, E., and Lamster, I. B. 2002. The Diagnostic Applications of Saliva a Review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 197–212.

Kelleher N.L. 2004. Top-down proteomics. *Anal. Chem.* 76: 197A-203A.

Langen H., Takács B., Evers S., Berndt P., Lahm H.W., Wipf B., Gray C., and Fountoulakis M. 2000. Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* 21: 411-429.

Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R., Garvik B.M., and Yates J.R. 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 17: 676-682.

Lootspeich F. 1999. Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 2476-2492.

Maldonado A., and Jorrián J. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* (pp. 1–16).

Mouriño, M. C. 2008. Proteómica bottom-up y top-down de organismos poco secuenciados. Identificación de especies. Mónica Carrera Mouriño. Universidad de Vigo

Ong, S.-E. 2002. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), 376–386.

Ong, S. E., and Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering*, 18(5), 195–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16100742>

Pando R. V. and Ferreira B. C. 2002. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*. 97-101

Patterson S.D. 2003. Proteomics: evolution of the technology. *Biotechniques* 35: 440-444

Pérez, L. J. 2009. Medicina de urgencias y emergencias. España: EdiDE.

Righetti, P. G. 2007. The Alpher, Bethe and Gamow of IEF, the alpha-Centauri of electrokinetic methodologies. Part II: immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 28(4), 545–55.

Robles, V. P., and Batista, F. 2003. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas, 97–108.

Rodríguez-Suárez, E., Siwy, J., Züribig, P., and Mischak, H. 2014. Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844(5), 884–98.

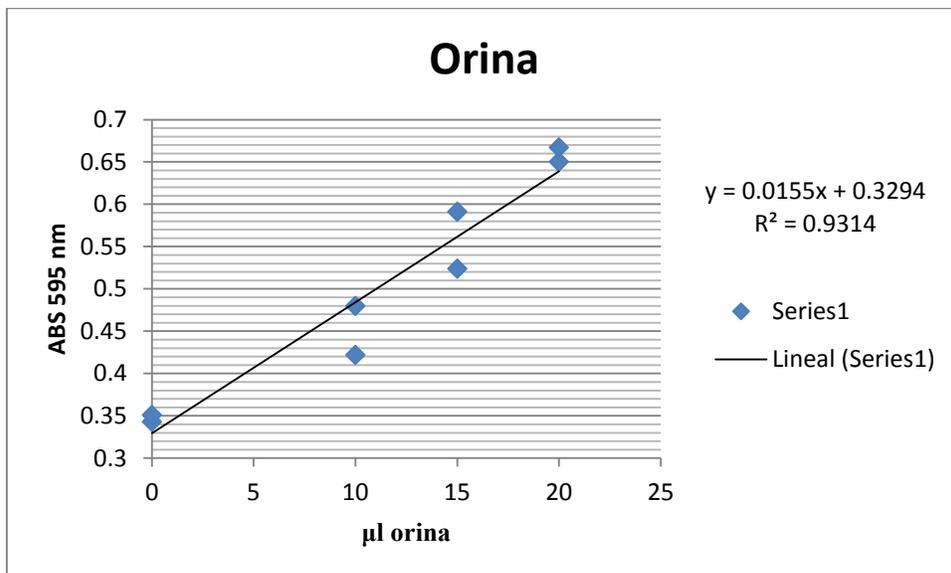
Rohm, J. K. 2004. Bioquímica. Texto y Atlas. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.

Schlatzer, D., Maahs, D. M., Chance, M. R., Dazard, J.-E., Li, X., Hazlett, F., and Snell-Bergeon, J. K. 2012. Novel urinary protein biomarkers predicting the development of microalbuminuria and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 35(3), 549–55.

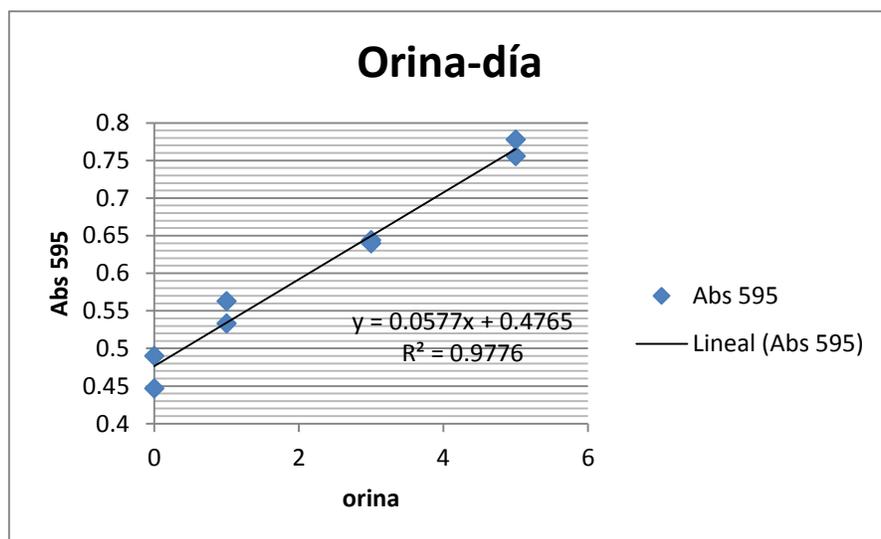
Service, F. T. 2002. Bio-Rad Protein Assay.

Wu C.C. and MacCoss M.J. 2002. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4: 242-250.

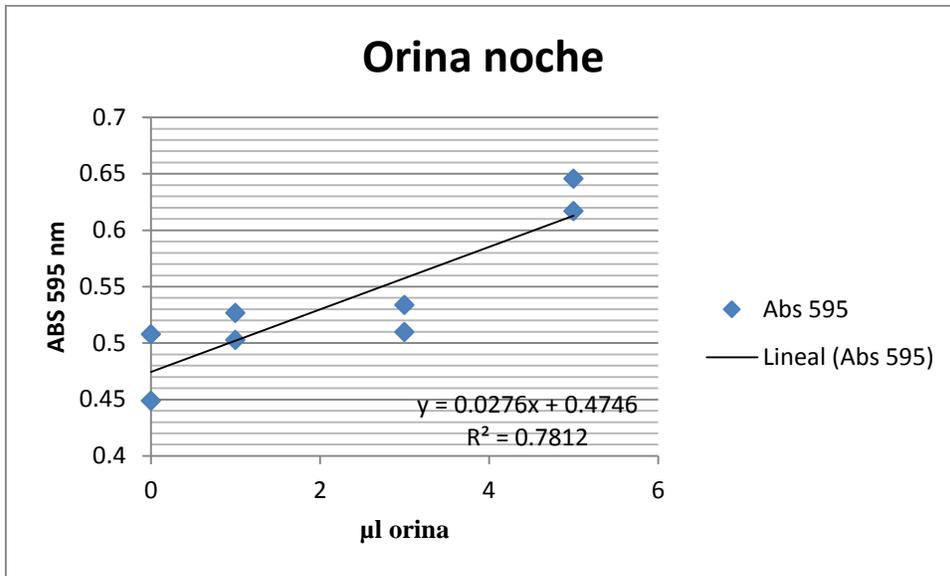
13 Anexos



Gráfica 2 Curva de cuantificación de proteínas en orina. Ensayo 1

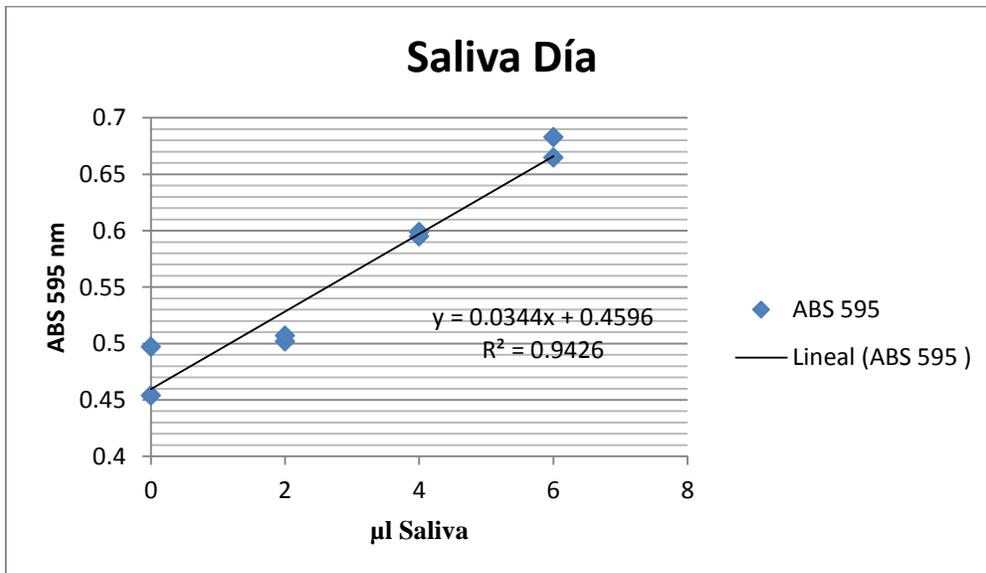


Gráfica 3 Curva de cuantificación de proteínas en orina-día. Ensayo 2



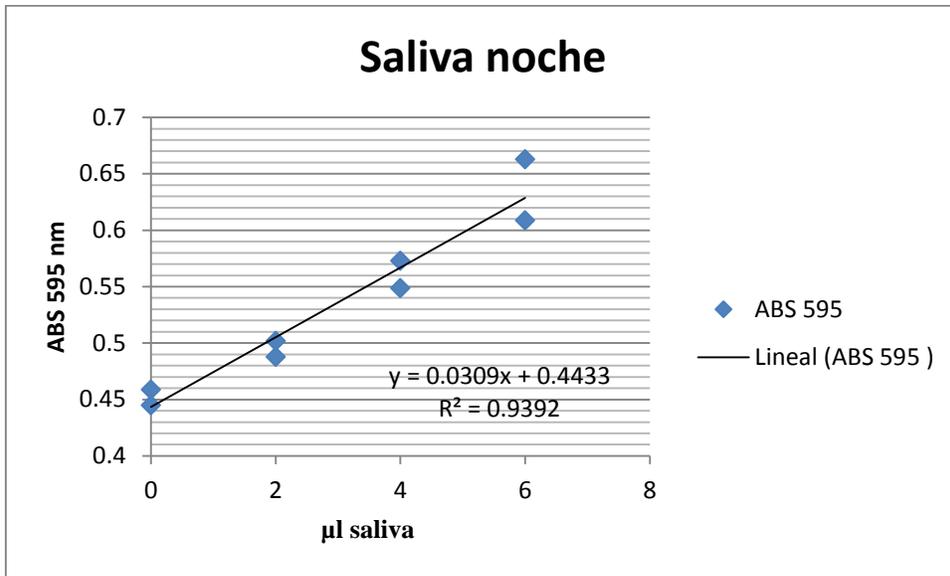
µl orina	Abs 595
0	0.508
	0.449
1	0.527
	0.503
3	0.534
	0.51
5	0.617
	0.646

Gráfica 4 Curva de cuantificación de proteínas en orina-noche. Ensayo 2



µl saliva	ABS 595 nm
0	0.454
	0.497
2	0.502
	0.507
4	0.599
	0.595
6	0.665
	0.683

Gráfica 5 Curva de cuantificación de proteínas en saliva-día



µl saliva	ABS 595 nm
0	0.459
	0.445
2	0.488
	0.502
4	0.573
	0.549
6	0.663
	0.609

Gráfica 6 Curva de cuantificación de proteínas saliva-noche