



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

MAYRA LEÓN ESTRADA

CON EL TEMA:

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA
LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS
HUMANAS PARA SER ANALIZADAS MEDIANTE
SDS-PAGE”**

MEDIANTE:

OPCION I

(TESIS PROFESIONAL)

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

ABRIL 2016

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos Y Pavón"

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 05 de abril del 2016

OFICIO NUM. DEP-CT-28-2016

C. MAYRA LEÓN ESTRADA

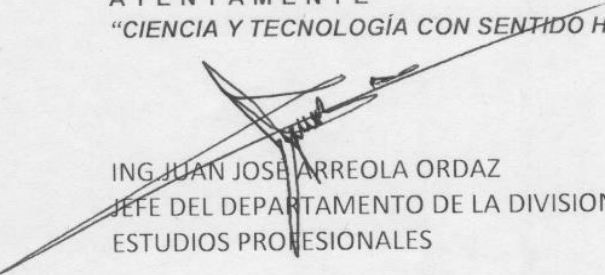
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. VICTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, DRA. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ ITURBE, Q.B.P. AURA FLORES PÉREZ en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

"ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA SER ANALIZADAS MEDIANTE SDS-PAGE"

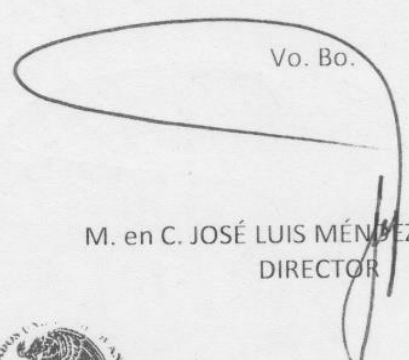
Registrado mediante la opción:
I(TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"


ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISIÓN DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam

Vo. Bo.


M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR



Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez,
Div. de Est. Profesionales



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tels. (961) 61 54285, 61 50461
www.ittg.edu.mx



Fecha de Incep. 2015.10.13
Fecha de Terminación 2016.10.13

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. PROBLEMAS A RESOLVER	12
5. ALCANCES Y LIMITACIONES	13
5.1 Alcances	13
5.2 Limitaciones	13
6. MARCO TEÓRICO	14
6.1 Ciencias ómicas	14
6.1.1 Proteómica	14
6.1.2 Usos de la proteómica	16
7.1 Electroforesis	19
7.1.1 Fundamento	19
7.2 Tipos de electroforesis	20
7.2.1 Electroforesis libre	20
7.2.2 Electroforesis zonal	21
7.2.3 Electroforesis SDS-PAGE	21
7.3 Preparación del soporte	25
7.4 Preparación de la muestra	26
7.5 Electroforesis en dos dimensiones	27
7.5.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés)	27
7.5.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE	29
7.6 Biofluidos	30
7.6.1 Saliva	30
7.6.2 Orina	31
8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	33
8.2 Preparación de la muestra	33

8.2.1	muestras de orina	33
8.2.2	Muestras de saliva.....	37
8.3	Electroforesis.....	39
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
10	CONCLUSIONES.....	52
11	RECOMENDACIONES.....	53
12	BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Pág.
Tabla 1 Preparación de la curva patrón.....	36
Tabla 2 Preparación para la muestra de orina.....	37
Tabla 3 Preparación para las muestras de saliva vespertina y diurna.....	39
Tabla 4 Distancias recorridas y pesos estimados.....	42
Tabla 5 Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína BSA	43
Tabla 6 Determinación de la concentración de proteína en muestras de orina	45
Tabla 7 Determinación de la concentración de proteínas en muestras de saliva.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Pág.
1	15
2	18
3	21
4	21
5	23
6	25
7	26
8	27
9	29
10	30
11	41
12	43
13	44
14	45
15	46
16	47
17	48
18	49

RESUMEN

En la actualidad el estudio de proteínas en biofluidos humanos como la orina y la saliva son de gran importancia para ser utilizados en el área de las ciencias ómicas, particularmente de la proteómica debido a que en esos fluidos se encuentran proteínas similares a las contenidas en la sangre, gracias a que su obtención es de manera no invasiva, facilitan su recolección. Dichas proteínas serán utilizadas para la identificación de nuevos biomarcadores que ayudarán a la detección de diversas enfermedades, por ello es de suma importancia realizar una adecuada manipulación de las muestras complejas a tratar ya que de ello dependerán posteriores técnicas a utilizar como son la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE), espectrometría de masas entre otras y así llegar a la identificación de dichos biomarcadores.

La electroforesis (SDS-PAGE) es el método más utilizado para la separación y análisis de las proteínas, se separan de acuerdo a su peso molecular cuando son sometidas a un campo eléctrico, se llevó a cabo en un soporte de gel de poliacrilamida con agente desnaturante de proteínas, el dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), así mismo se utilizó un marcador de pesos moleculares conocidos para hacer una estimación de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en cada muestra, para que se lograra una buena apreciación de las proteínas se utilizaron métodos similares de extracción y purificación de proteínas de acuerdo a los componentes de cada muestra, tales como sales, detritos celulares, material genético, llevando a cabo los procesos de centrifugación, desalación, eliminación de restos de material genético y concentración de la muestra.

Se lograron identificar dos bandas con pesos moleculares estimados de 73.68 y 51.62 kDa en muestra de orina y seis bandas de pesos moleculares estimados de 70.07, 51.25, 37.49, 31.02, 29.69 y 11.40 kDa en las muestras de orina y saliva, respectivamente, comparando con otras fuentes bibliográficas se pueden asociar con algunas proteínas ya identificadas.

1. INTRODUCCIÓN

Como su etimología lo indica “foresis” (movimiento) y “electro” (electricidad), es el movimiento producido por un campo eléctrico sobre determinadas partículas sobre una matriz o soporte fijo, en nuestro caso las proteínas. Alrededor de los últimos 50 años, las técnicas de electroforesis han evolucionado al tiempo que han mejorado los sistemas de soluciones amortiguadoras, los instrumentos y las técnicas de visualización. La electroforesis de proteínas puede ser usada para una variedad de aplicaciones como: purificación de proteínas, evaluación de la pureza, su punto isoeléctrico (pI) e inclusive su actividad enzimática. De hecho un significativo número de técnicas incluida la electroforesis en gel de poliacrilamida, el enfoque isoeléctrico (IEF) y la electroforesis de dos dimensiones (2-D) pueden ser agrupados bajo el término “electroforesis de proteínas” (Rabilloud, 2010).

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 y consiste en la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico en una primera dimensión y por su peso molecular en la segunda dimensión, haciendo posible obtener una distribución casi uniforme de manchas de proteínas a través de un gel de dos dimensiones (Farrell, 2010). La innovación clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, por sus siglas en inglés) 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 con gradientes de pH inmovilizado (IPG, por sus siglas en inglés), 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 celulares entre distintos grupos de investigadores, facilitando el intercambio de información y convirtiendo a esta técnica en el estándar para el análisis proteómico (Righetti, 2007).

En la era post-genómica, el desarrollo tecnológico aplicado a la proteómica ha conseguido integrar un conjunto de metodologías indispensables por su elevada precisión y eficacia, así como herramientas útiles para llevar a cabo el análisis de proteínas a gran escala. La proteómica definida 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. Inicialmente fue definida 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 (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.

La presente investigación aborda los procedimientos para estandarización de la preparación de muestras biológicas destinadas a ser analizadas mediante la técnica de Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2D SDS-PAGE) para el laboratorio de investigación en Ciencias Ómicas de ECOSUR. Se realizaron análisis electroforéticos en muestras de fluidos humanos como orina 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 bioquímicas complejas. Debido a sus componentes tales como sales, calcio, urea, aminoácidos, detritos celulares, amilasa que pueden presentar algunas dificultades al momento de realizar el procedimiento. El trabajo realizado aporta un procedimiento estandarizado 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). Una adecuada selección de la 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).

Es por ello que se realizó la estandarización del primer paso de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 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; amilasa de saliva, así como urea en la orina. Se realizan procedimientos de diálisis, concentración, dilución y la cuantificación 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 métodos de extracción de proteínas y análisis del patrón electroforético en muestras de orina y saliva.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer diferentes métodos para la extracción de proteína en orina y saliva.
- Analizar el patrón electroforético de las proteínas aisladas.

4. PROBLEMAS A RESOLVER

En la actualidad existen muchas técnicas para la separación de proteínas, en particular en las ciencias ómicas, haciendo énfasis en la proteómica que utiliza la electroforesis en dos dimensiones para separar miles de proteínas al mismo tiempo. Sin embargo, dicha técnica es muy sensible a las condiciones químicas de los componentes de la mezcla, 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 amilasa de saliva, así como urea en orina, ya que estos dificultan la apreciación de las proteínas en la resolución del gel de poliacrilamida, por lo tanto la resolución de las proteínas se llevó a cabo en SDS-PAGE para que posteriormente sea utilizada óptimamente en la electroforesis bidimensional (2-D SDS PAGE). Los resultados obtenidos se aplicarán en el análisis de enfermedades como la preeclampsia en mujeres embarazadas en otra parte del proyecto.

5. ALCANCES Y LIMITACIONES

5.1 Alcances

Se logró la estandarización de las metodologías utilizadas para la preparación de las muestras de orina y saliva humana.

5.2 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.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 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 & Ferreira, 2002).

6.1.1 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, fase de ciclo 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

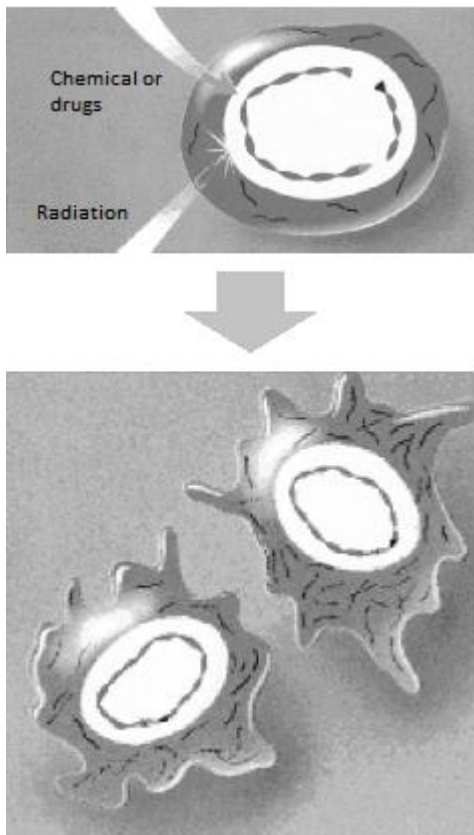


Figura 1 perturbaciones ambientales o experimentales que pueden cambiar enormemente a las proteínas expresadas en una célula, incluso cuando los cambios en el código de ADN son menores o ausentes. Tomado del manual bio-rad electroforesis en 2-D para proteómica

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 imagen con una precisión del estado de una célula viva (Lubec et al. 1999), el cual puede alterarse por varias afecciones (Figura 1). 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 e identificar los cambios específicos

cuantitativos y cualitativos de la proteína.

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 el 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 como consecuencia de padecimientos como el 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).

6.1.2 Usos 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 2).

Identificación de proteínas

Métodos bien conocidos incluyen la secuenciación de bajo rendimiento a través de la degradación de Edman (Edman & Begg, 1967). Las técnicas proteómicas de alto

rendimiento se basan en la espectrometría de masas (EM), por lo general en las huellas peptídicas dactilares o la secuenciación de novo de detección de la repetición en instrumentos capaces de reproducir más de una ronda de la EM. Los 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). Existen 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

Se sirve de una de las ramas de la bioinformática, la cual se dedica a la búsqueda en bases de datos para el ensamblaje de una posible proteína o péptido partidos, así como la asignación funcional de dominios, el plegamiento tridimensional, la predicción de la función de la secuencia, y las relaciones evolutivas de proteínas.



Figura 2 Usos de la proteómica. Tomada del libro omics (Barh, 2013)

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, proteínas –ADN, proteínas-ARN).

Modificación de Proteínas

Casi todas las proteínas son modificadas a partir de su secuencia de aminoácidos, llamada modificación postraduccional. Existen métodos especializados que se han desarrollado para el estudio de 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, 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 Electroforesis

7.1.1 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 ion, 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).

7.2 Tipos de electroforesis

7.2.1 *Electroforesis libre*

El campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones (Fig. 3). 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.

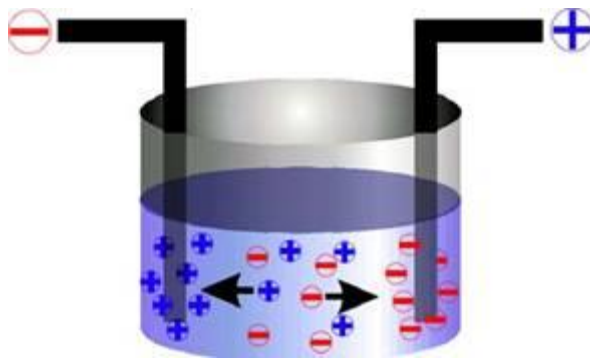


Figura 3 Electroforesis libre

7.2.2 *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. 4). 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).

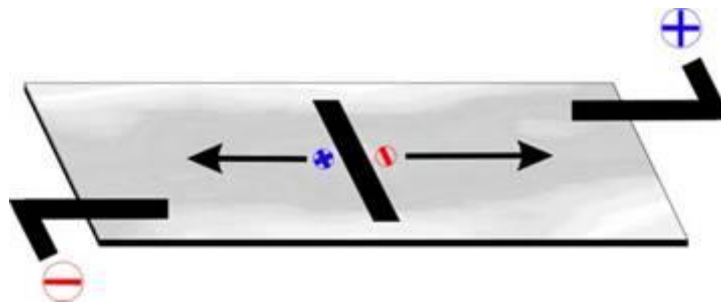


Figura 4 Electroforesis zonal

7.2.3 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 inglés). 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 solución amortiguadora 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 (Fig. 5), incrementando con esto la resolución de la electroforesis

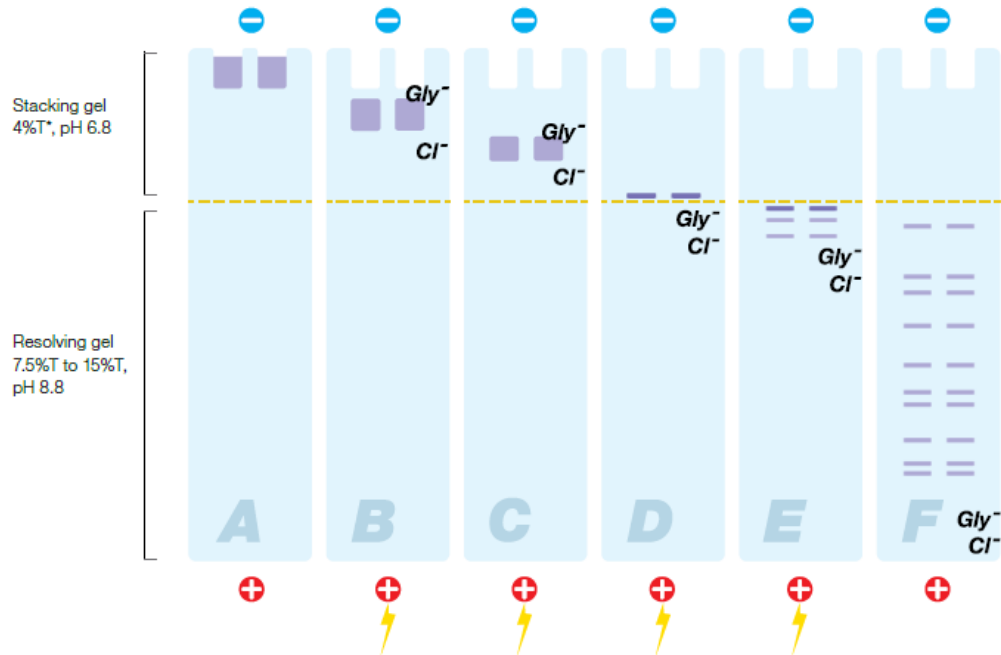


Figura 5 Migración de proteínas e iones tampón en un sistema PAGE desnaturalizante discontinuo. A) Las proteínas de muestra desnaturalizada son cargadas en los pozos, B) el voltaje se aplica y las muestras se mueven en el gel. Los iones cloruro que ya están presentes en el gel (que conducen iones) corren más rápido que las proteínas unidas al SDS formando un frente de iones. Los iones del glicinato (iones de arrastre) fluyen en el buffer de corrida y de un frente detrás de las proteínas. C) se crea un gradiente de voltaje entre iones cloruro y glicinato, los cuales crean un sándwich entre ellos, D) las proteínas se apilan entre el frente de los iones cloruro y glicinato frente. En la interfaz entre los geles de apilamiento y resolución, aumenta el porcentaje de acrilamida y disminuye el tamaño de poro, E) El tamaño de poro más pequeño del gel de resolución comienza a separar las proteínas en base al peso molecular solamente, ya que la relación de carga-masa es igual en todas las proteínas de la muestra, F) Las proteínas individuales se separan en patrones de bandas ordenados de acuerdo con sus pesos moleculares. (Tomado de guía de electroforesis en gel de poliacrilamida y detección, bio-rad)

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 como el Lauril Sulfato de Sodio (SDS por sus siglas en ingles) 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 aniónico 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 (mm) de cada una de las proteínas estándar en comparación con el logaritmo de su peso molecular (Catro, 2005).

7.3 Preparación del soporte

El soporte se prepara a partir del monómero acrilamida (fig. 6) 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.

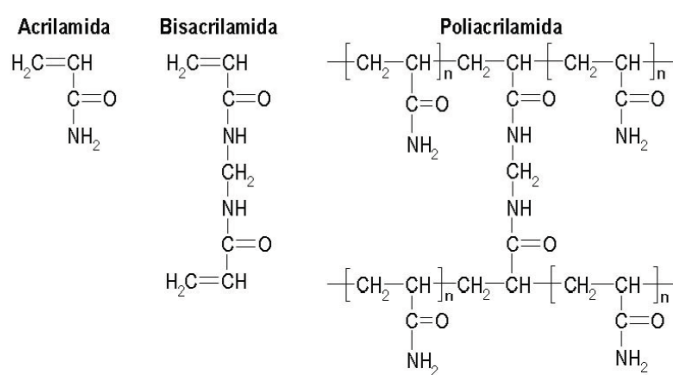


Figura 6 Estructura de la acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida.
(Tomado del cultek)

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 (Sambrook, 1998).

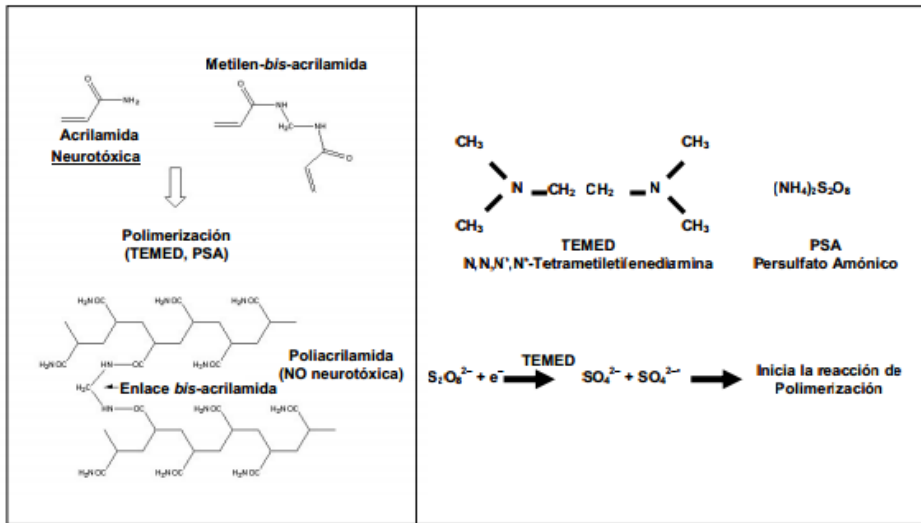


Figura 7 Polimerización del soporte

7.4 Preparación de la muestra

Para aprovechar las ventajas del alta resolución de 2-DE, las proteínas de la muestra tiene que ser desnaturalizadas, desglosadas, 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 disrupción 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)

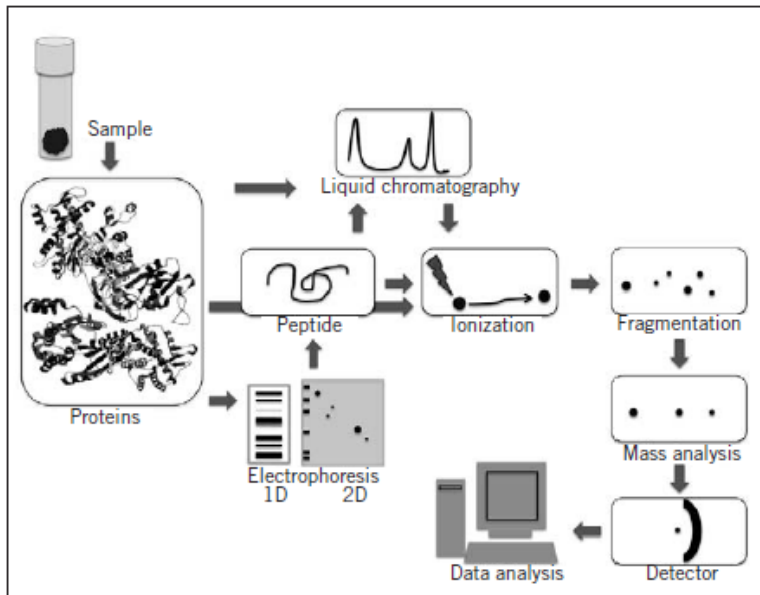


Figura 8 Diferentes metodologías pueden combinarse en estudios proteómicos. Metodologías más comúnmente utilizadas que implican la extracción de proteínas de la muestra, la separación por uno-(1-D) o de dos dimensiones (2-D) de electroforesis y/o cromatografía líquida, la ionización, la fragmentación, el péptido el análisis y la detección y el análisis de datos. Tomado de proteómica: metodologías y aplicaciones al estudio de enfermedades humanas.

7.5 Electroforesis en dos dimensiones

7.5.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés)

Esta primera dimensión se lleva a cabo en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG, por sus siglas en inglés), que consta de una matriz de gel de poliacrilamida, con una mezcla de anfólitos, que migran para formar un gradiente de pH estable. Existen en diferentes tamaños y rangos de pH.

Punto isoelectrico (pI)

Las diferencias en las proteínas como su pI son la base de la separación por IEF. En el punto isoelectrico (pI), la carga media de todas las formas de una proteína es cero. Por

tanto, cuando una proteína se encuentra en su pH isoelectrónico no migra en un campo eléctrico. Este efecto es el fundamento de una técnica sensible de separación de proteínas llamada isoelectroenfoque. Se somete una mezcla de proteínas a un fuerte campo eléctrico en un medio diseñado específicamente para tener un gradiente de pH. Las moléculas cargadas positivamente se mueven hacia el polo negativo y las moléculas cargadas negativamente se mueven hacia el polo positivo. Cada proteína migra hasta que alcanza el punto en donde el pH es igual a su punto isoelectrónico. En este punto, la proteína no tiene carga neta y queda inmóvil, así, cada proteína de una mezcla se localiza en una pequeña región que se encuentra a su punto isoelectrónico.

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.

Isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés)

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 es igual a su pI, quedando sin carga y se detendrá la migración (Figura 11). Si esta proteína debería difundirse a una región de menor pH, lo hará obteniendo un protón y se ven obligadas a migrar 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 cargará negativamente y será impulsado hacia el ánodo. De esta manera, las proteínas se condensan o se centran, en bandas, 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).

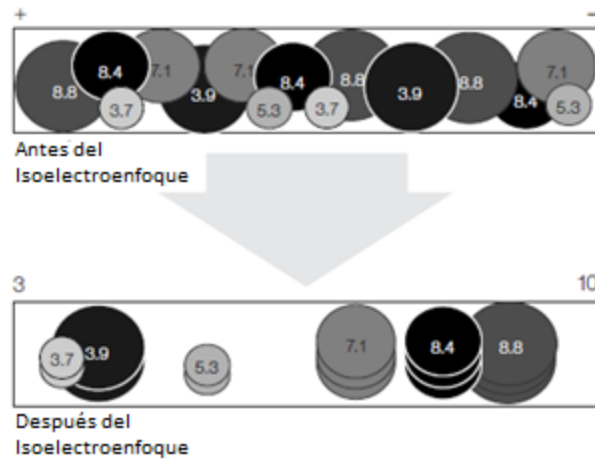


Figura 9 Una mezcla de proteínas se resuelve en una tira de IPG de pH 3-10 de acuerdo con su pI de cada proteína e independientemente de su tamaño, como se describe en la sección de IEF. Modificado del manual 2-d Electrophoresis for proteomics

7.5.2 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.

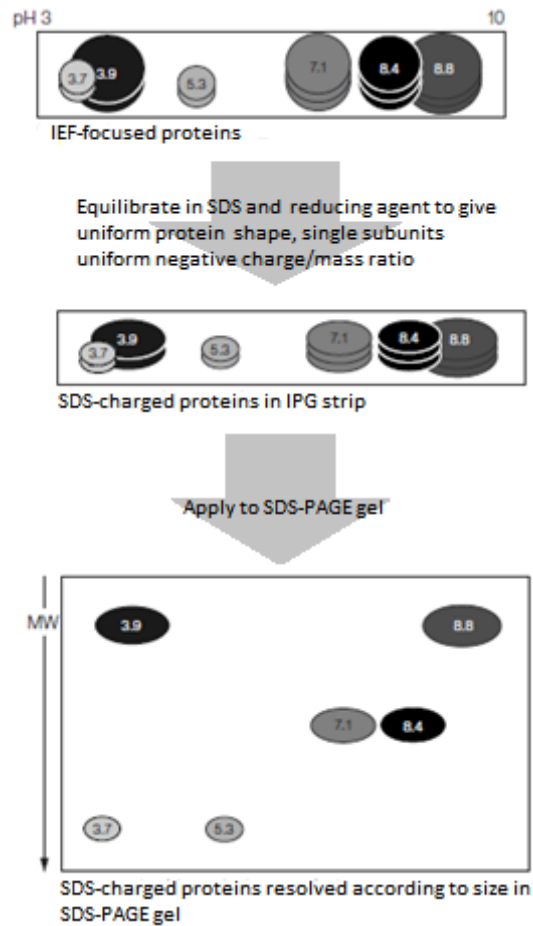


Figura 10 Diagrama esquemático que muestra la separación de proteínas por SDS-PAGE después de la separación por IEF. Modificado del manual 2-d

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

7.6 Biofluidos

7.6.1 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).

7.6.2 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 derivan de los procesos de filtración, secreción y reabsorción en el riñón. (Schlatzer et al., 2012)

Las investigaciones 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 fue empleado como una guía de cómo realizar 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

Toma de muestra

Para la recolecta de muestra de orina se utilizó un vaso recolector 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:

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 rotuló el recipiente con nombre, edad y fecha, y se procedió a la preparación de la muestra.

Preparación de la muestra

4. Se colocaron 50 ml de muestra en un tubo cónico de polipropileno y se utilizó una centrifuga Beckman modelo J-21C, se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos.

5. Posteriormente se realizó una ultrafiltración con una columna Amicon (corte 10, 000 Da) millipore a 4 000 x g por 10 minutos, se desechó el filtrado y se conservó el concentrado.
6. Al concentrado se le agregó 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).
7. Para la precipitación de las proteínas se procedió según referencia. Brevemente 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.
8. 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.
9. El sedimento resultante se solubilizó con 1000 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 15 Mm Tris).

Segundo ensayo

Toma de muestra

1. Se tomó la muestra de orina diurna y vespertina en un vaso recolector graduado 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.
2. Se colectaron 15 ml de orina y se dieron las mismas indicaciones de los pasos 1, 2 y 3 del primer ensayo.

Preparación de la muestra

3. Se colocaron los 15 ml de orina recolectada en un tubo y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos con una Beckman modelo J-21C.

4. 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 a temperatura ambiente durante una hora.
5. 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.
6. 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.
7. El botón resultante se solubilizó con 200 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% TDT, 15 Mm Tris)

Tercer ensayo

Toma de muestra

1. En un vaso recolector estéril graduado, añadir el inhibidor de proteasas mini complete® rocher a una concentración de 10x, para posteriormente recolectar 50 ml de la muestra de orina matutina.
2. Se colectaron 50 ml de orina y se dieron las mismas indicaciones de los pasos 1, 2 y 3 del primer ensayo.

Preparación de la muestra

3. Se colocaron los 50 ml de muestra de orina en un tubo cónico y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C, las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga refrigerada (marca Thermo scientific, modelo Heraeus™ Megafuge™ 40)
4. Posteriormente se continuo con una serie de ocho ultrafiltraciones en una columna Amicon ® ultra 15 (corte 10,000 Da) a 3350 x g durante 10 minutos a 25°C, se centrifugó primero los 50 ml de orina para posteriormente agregar agua estéril en

cada centrifugación y por ultimo una solución de 100 Mm NaCl para la eliminación de sales., hasta obtener un concentrado de orina de 500 µl.

5. Se recuperaron los 500 µl y se trataron con nucleasa mix GE Healthcare como señala el proveedor, e incubar a temperatura ambiente durante un período de 120 minutos.
6. Se precipitaron las proteínas con una mezcla fría de acetona-metanol (8:1) con un volumen final de 83.2% y se dejó incubar toda la noche (-20°C)
7. Se centrifugó la muestra a 4 000 x g durante un lapso de 15 min a 4 °C y se procedió a lavar el botón resultante con 1 ml de acetona seguido de 1 ml de metanol y se dejó secar a temperatura ambiente
8. Las proteínas resultantes se disolvieron en agua estéril y se almacenaron en congelación hasta su utilización.

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 fracción VII (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

µl BSA (1 mg/µl)	µl NaCl 0.15 M	µl Rx Bradford (Azul Coomassie 595 nm)	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 agitador mecánico 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. Se siguió la misma metodología para los ensayos posteriores.

Tabla 2 Preparación para la muestra de orina

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

Cada tubo con los reactivos se colocó en el agitador mecánico 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 una mezcla inhibidora de proteasas a una concentración de 10 x (mini complete® de la marca Roche). 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 12 000 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 -20°C durante una hora, se procedió a una segunda centrifugación a 12 000 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. El sedimento se solubilizó en 100 µl de tampón (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% TDT, 15 Mm Tris).

Segundo ensayo

Toma de muestra

Se recolectaron 3 ml de muestra de saliva en un tubo estéril con minicomplete 1X por la mañana entre 8:00 y 10:00 a.m. sin haber ingerido cualquier tipo de alimento.

Preparación de la muestra

Se centrifugaron la muestra a 3350 x g por 30 minutos a 4°C, enseguida se concentró la muestra con una columna Amicon ® ultra 15 (corte 10,000 Da) hasta un volumen de 500 µl mediante un proceso de centrifugación a 3350 x g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminaron los ácidos nucleicos tratando el concentrado de saliva con nucleasa mix por 120 minutos a temperatura ambiente.

Para la precipitación de proteínas se utilizó una mezcla fría de acetona-metanol (8:1) con un volumen final de 83.2% y se incubó durante toda la noche a -20°C, concluido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 12 000 x g por 30 minutos a 4°C, se decantó el líquido y se lavó tres veces con acetona dejándose secar al aire libre, y finalmente solubilizar el botón resultante en agua estéril y almacenar a -20°C hasta su uso.

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. Para el segundo ensayo la preparación fue la misma.

Tabla 3 Preparación para las muestras de saliva vespertina y diurna

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

Se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, en una cámara mini protean tetra cell de la marca Bio-rad.

Se preparó el gel de poliacrilamida de acuerdo al manual de laboratorio molecular clonning tomo III; gel separador al 15% y un gel concentrador al 5% con las cantidades mencionadas en dicho manual. Se preparó primero el gel separador, se le agregó 1 ml de metanol para alinear el gel y observar la polimerización del mismo, posteriormente se eliminó el metanol y finalmente se le agregó el gel concentrador, se procedió a cargar las muestras tratadas previamente por un proceso de calentamiento de 5 min en buffer Leamli. Los geles se corrieron a 200 v durante dos horas y enseguida se tiñeron con azul de Coomasie® G- 250.

Para calcular los pesos moleculares de las proteínas se utilizó el kit precisión plus protein, dual color standards de la marca Bio-rad, que contiene diez bandas de proteínas de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 11.

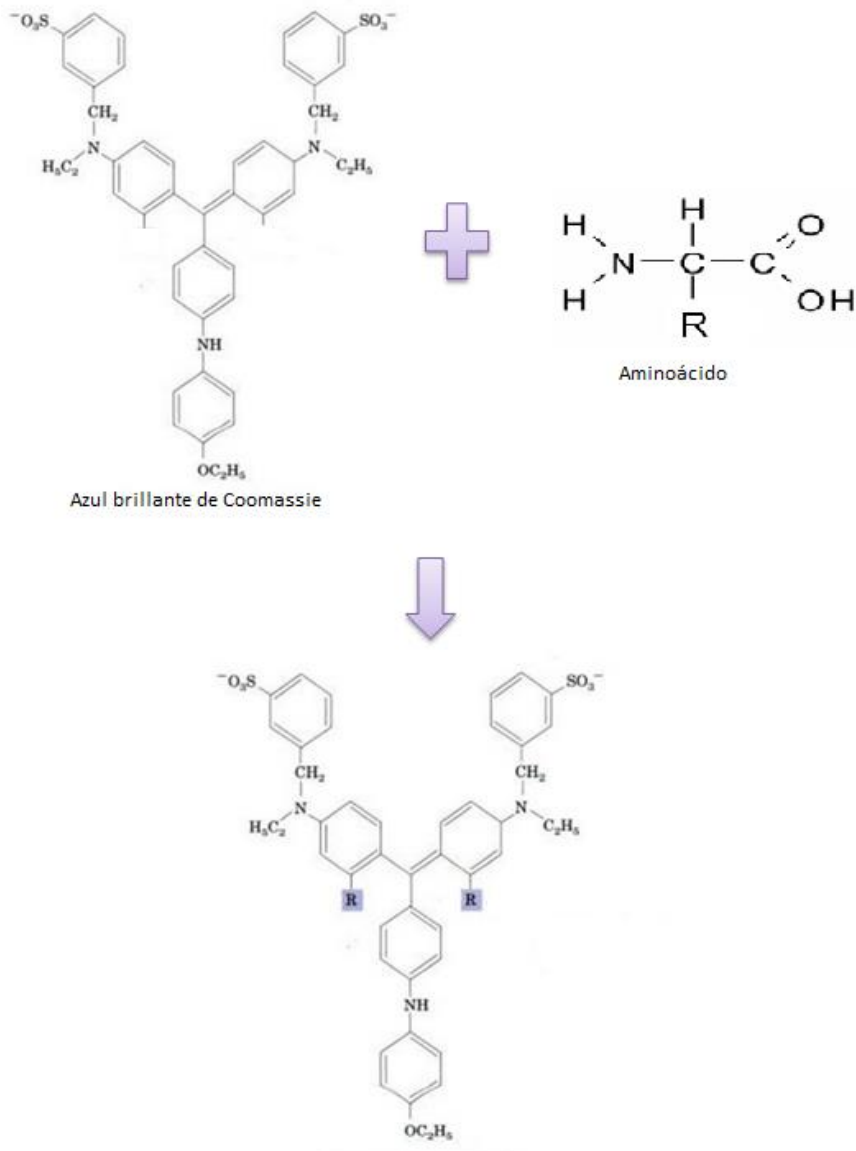


Figura 11 Unión del colorante azul de Coomassie con aminoácidos

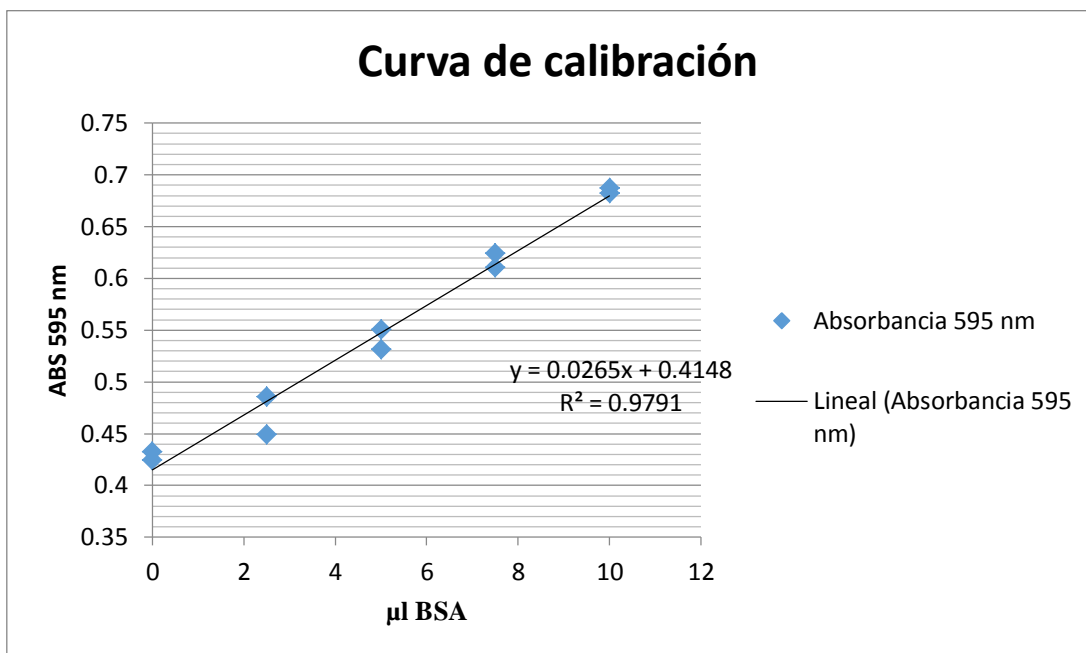
La estimación de los pesos moleculares de las bandas observadas mediante la electroforesis se realizó conociendo el peso molecular de una proteína, tomando como referencia, la fracción VII de Albumina de suero bovino® (BSA) marca SIGMA-ALDRICH, con un peso molecular de 66.382 kDa.

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 4 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 5 Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína BSA

μl BSA	ABS 595 nm	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2.5	0.449	0.7879
	0.485	
5	0.550	0.9487
	0.531	
7.5	0.610	1.0174
	0.624	
10	0.682	1.0177
	0.687	

Resultados de Orina humana.

Ensayo I

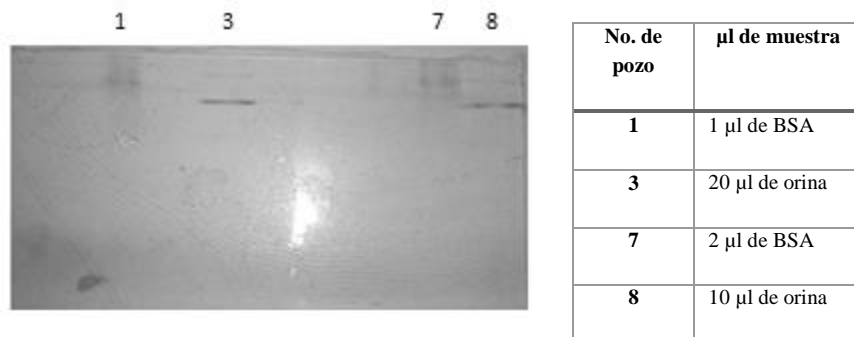


Figura 12 Electroforesis del extracto total de proteínas contenidas en orina humana

En la figura 12 se observan los carriles 3 y 8 la electroforesis de las muestras de orina mostrando una banda bien marcada con un peso de 40 kDa respectivamente, mientras que

en los carriles 1 y 7 se muestra la electroforesis de una proteína estándar BSA con un peso molecular conocido de 66.382 kDa.

Ensayo II

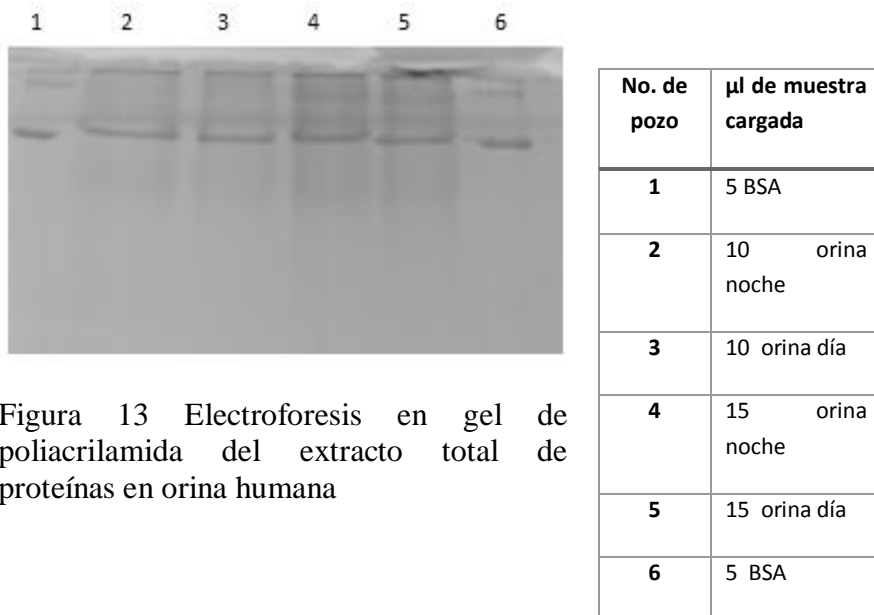


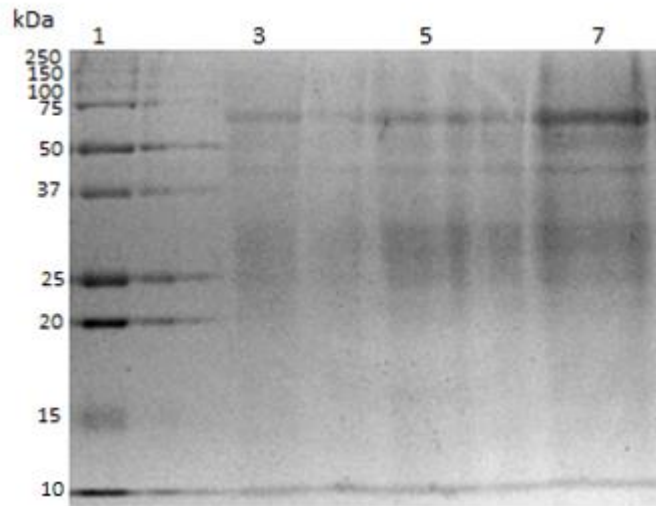
Figura 13 Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto total de proteínas en orina humana

En la figura 13 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.

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 µg/µl y por la noche 2.849 µg/µl.

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.

Ensayo III



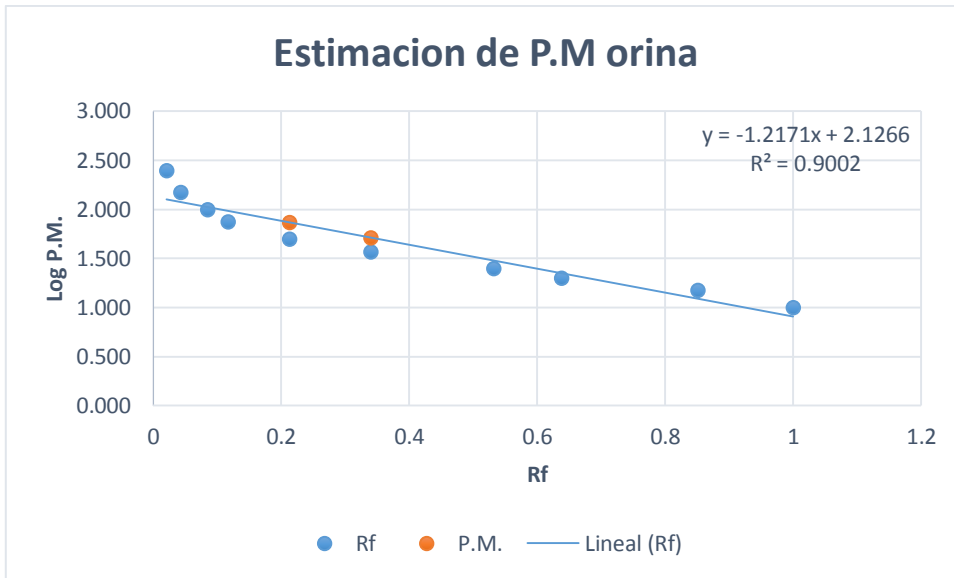
No. de pozo	µl de muestra
1	5 marcador de peso molecular
3	5 orina
5	10 orina
7	15 orina

Figura 14 Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas de orina humana

En la tabla 12 se expresa las concentraciones obtenidas a partir de la metodología del ensayo III con un promedio de 0.918 µg/µl.

Tabla 6 Determinación de la concentración de proteína en muestras de orina

Muestra inicial (ml)	Proteína de muestra concentrada (µl)	Concentración (µg/µl)
50	500	0.790
15 Diurna	500	2.2028
15 Vespertina	500	2.849
50	500	0.918



Gráfica 2 Estimación de los pesos moleculares de las proteínas obtenidas de la muestra de orina

En la gráfica 2 se pueden observar la estimación de los pesos moleculares de las dos bandas que se distinguen en el gel de poliacrilamida al 15% (fig. 15), obtenido de la metodología del ensayo III, los pesos obtenidos se observan a continuación:

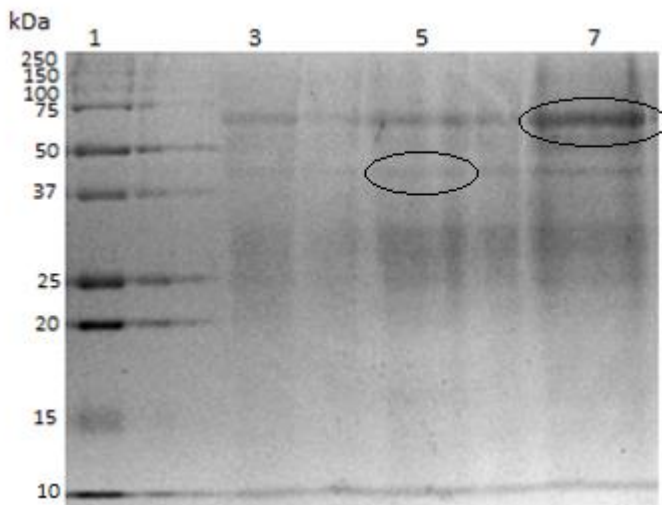


Figura 15 Gel de poliacrilamida al 15% con muestra de orina y marcador de proteínas en el carril 1, las bandas que aprecian tienen un peso molecular estimado de 73.68 y 51.62 kDa respectivamente

Resultados en saliva

Ensayo I

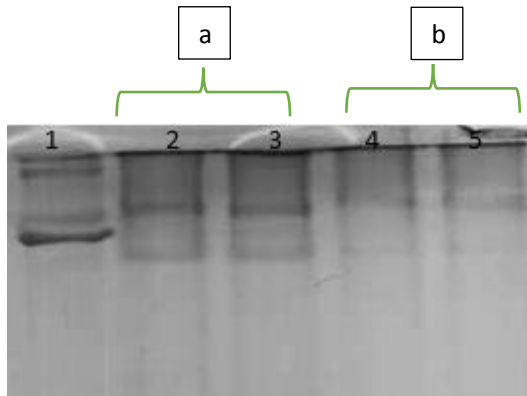


Figura 16 Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto total de saliva humana, carril 1 5 μ l BSA, a) 20 μ l de muestra de saliva-día y b) 10 μ l muestra de saliva-noche.

En la figura 16 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.

Ensayo II

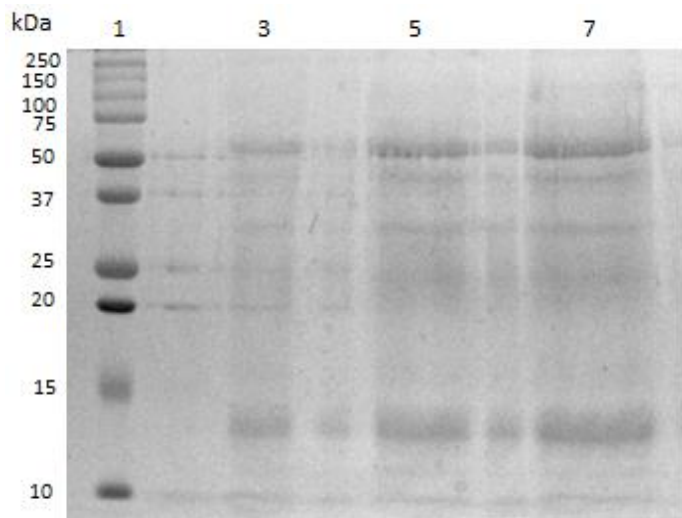
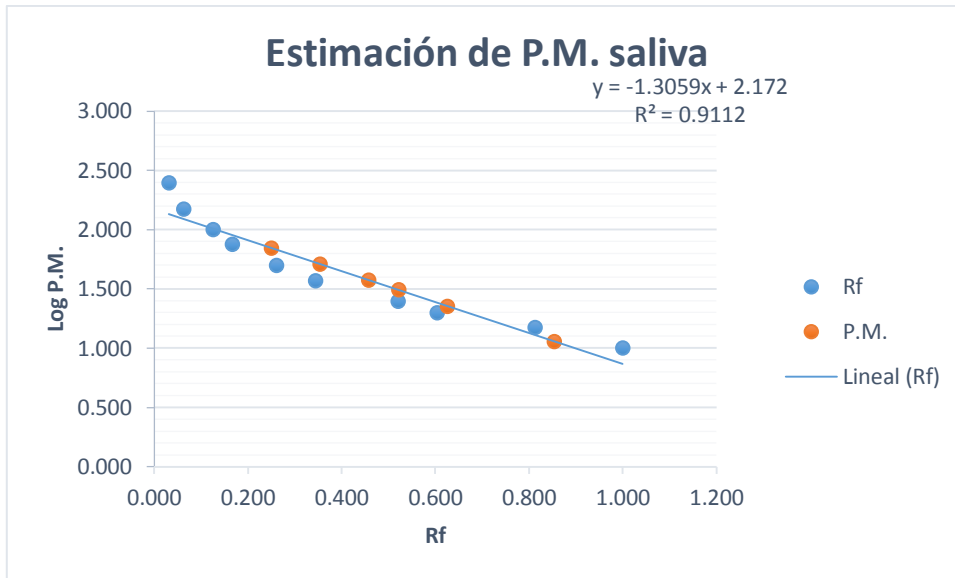


Figura 17 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de proteínas en saliva. En el carril uno se cargaron 5 µl del marcador precisión plus protein™, carril tres 5 µl, carril cinco 10 µl y en el carril siete 15 µl de saliva

Tabla 7 Determinación de la concentración de proteínas en muestras de saliva

Muestra inicial (ml)	Proteína de muestra concentrada (µl)	Concentración µg/µl
1.5 Diurna	500	1.477
1.5 vespertina	500	1.2092
3	500	2.2727



Gráfica 3 Estimación de los pesos moleculares de las proteínas obtenidas de la muestra de saliva

En la gráfica 3 se observa la estimación de los pesos moleculares de las dos bandas que se distinguen en el gel de poliacrilamida al 15% (fig. 17), obtenido de la metodología del ensayo II, los pesos obtenidos son:

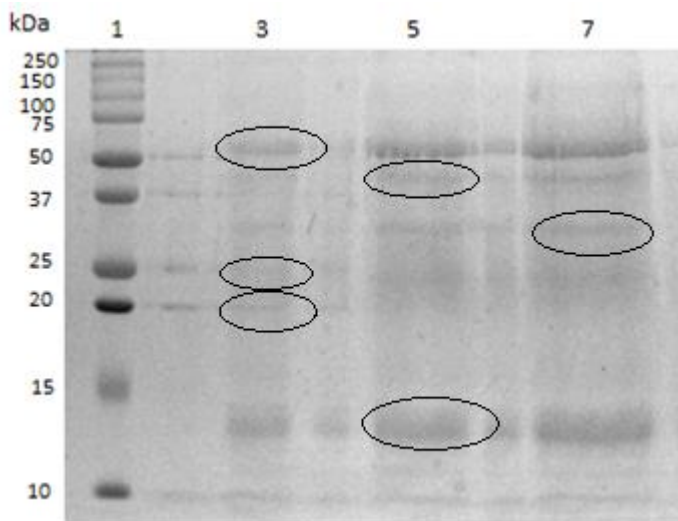


Figura 18 Gel de poliacrilamida al 15% con muestra de saliva y marcador de proteínas en el carril 1, en el carril tres se encuentran bandas con un peso estimado de 70.07, 31.02 y 29.69 kDa, en el carril cinco 51.25 y 11.40 kDa y en el carril siete 37.49 kDa

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, se puede concluir que se logró la estandarización de las diferentes metodologías para la preparación de las muestras de orina y saliva.

En las muestras de orina se lograron obtener dos bandas bien definidas dentro del rango de 75 a 50 kDa como se puede observar en la figura 15, y obteniendo una concentración de 0.918 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mientras que en la muestra de saliva se obtienen siete bandas abarcando un mayor rango, que van de 75 a 10 kDa como se muestra en la figura 18. En la tabla 7 se muestran las concentraciones de proteínas obtenidas en muestras de saliva diurna de 1.477 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y en saliva vespertina de 1.2092 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no habiendo una diferencia significativa, mientras que en la última muestra se observa una concentración de 2.2727 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ la mayor apreciación de bandas en muestras de saliva se debe a que en la saliva humana se albergan proteínas de relevancia clínica y aproximadamente el 30% de las proteínas en la sangre también están presentes en la saliva como indican en el artículo “Salivary proteomics in biomedical research” mientras que en la orina son pocas las proteínas que se logran filtrar en la ultrafiltración del plasma y de las vías urinarias en sí.

Revisando las similitudes de los resultados obtenidos en esta investigación, con los resultados del artículo *“Proteins of human urine. III. Identification and two dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins”* podemos asociarlos con algunas de las proteínas que constituyen la orina como se muestra en el siguiente cuadro:

Proteínas	Peso molecular (kDa)
Albumina	68
Hemopexina	57
Transferrina	80
Orosomucoide	40
α-Antitripsina	54

En cuanto a las muestra de saliva de acuerdo con el artículo “Comparación de la concentración y perfil de proteínas totales en saliva de mujeres de distintas edades.” se lograron identificar las proteínas que se observan a continuación:

Posibles proteínas	Peso molecular (kDa)
Lactoferrina	80
Inmunoenzima α-amilasa	50
Proteínas ricas en prolina (PRP)	37
Peroxidasa	30
Cistatina	13
Inmunoglobulina a	15

Según los artículos reportados las proteínas que se lograron revelar en el gel SDS-PAGE en saliva pueden estar relacionadas con proteínas ricas en prolina (PRP), peroxidasa, Cistatina y en las muestras de orina con α -antitripsina y amilasa.

La identificación de las proteínas serán de gran utilidad para estudios posteriores, que dependiendo a como estén expresadas darán como resultado la creación de biomarcadores para la detección de diversas enfermedades.

Se realizaron varios ensayos en los procedimientos de extracción de las proteínas, en las diferentes muestras de saliva y orina para tener un mejor rendimiento. En las muestras de orina hubieron variaciones en cuanto a reactivos para la eliminación de material genético presente (RNAasa y Nucleasa mix) obteniendo mejores resultados con Nucleasa mix (GE Healthcare) ya que se logró eliminar el material genético que contenían las muestras, ayudando a tener una mejor resolución de las proteínas en el gel y así como también en la serie de ultrafiltraciones con la columna Amicon para concentrar la muestra y eliminar las

sales que hacen interferencia en la electroforesis, en cuanto a los procedimientos de saliva también se utilizaron dos tipos de reactivos para eliminar el material genético existente, los mismos que se utilizaron en orina y se optó por concentrar la muestra.

Dichas variaciones dieron resultados positivos obteniendo una mejor resolución de las bandas de proteínas y metodologías adecuadas para la preparación de los diferentes fluidos biológicos, en este caso orina y saliva, para que posteriormente sean utilizadas en próximas técnicas de identificación de proteínas, especialmente electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE), partiendo de esos resultados y continuar con la identificación de las proteínas hasta poder llegar a determinar biomarcadores, que serán de gran utilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades. Así pues, la muestra debe ser manejada con el máximo cuidado, prestando especial atención a evitar cualquier contaminación.

10 CONCLUSIONES

El presente estudio se planteó con la finalidad de poder utilizar biofluidos humanos para la identificación de proteínas mediante el método de electroforesis bidimensional como herramienta de investigación en la proteómica, es por ello que se necesita una adecuada extracción de la proteína a estudiar ya que de eso depende el adecuado desarrollo de la metodología, así como la obtención de resultados confiables y reproducibles.

Los procedimientos experimentales utilizados en dicho trabajo dieron resultados satisfactorios por lo que se puede concluir lo siguiente:

1. En las centrifugaciones se eliminaron células y moléculas con masas y densidades distintas, y lograr sedimentarlas con velocidades diferentes, como la urea en la muestra de orina y amilasa en las muestras de saliva, comenzando así la purificación de las proteínas
2. Con la serie de ultrafiltraciones se logró eliminar las sales en orina que causan interferencia al momento de llevar a cabo la electroforesis.
3. Se logró eliminar el material genético contenido en cada muestra con un kit comercial, Nucleasa mix.

4. Con la precipitación se logró concentrar y purificar las proteínas en las muestras de orina y saliva.
5. Con los resultados comparados en otros artículos, en cuanto a lo pesos moleculares podemos darnos una idea y seguir analizando las proteínas más detalladamente para continuar con investigaciones que posteriormente cumplan con el objetivo de encontrar biomarcadores para distintas enfermedades.

Considero que el tiempo y el costo son factores primordiales para que el trabajo no se concluyera hasta un análisis de las proteínas obtenidas mediante la electroforesis 2D-PAGE. Dichos procedimientos formaran parte de la base analítica del laboratorio de ciencias ómicas 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, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, trasplante de órganos y estudios farmacodinámicos, entre otras, que ayuden a prevenir y a diagnosticar diversas enfermedades. Los biofluidos de orina y saliva humana se utilizaran en particular para preeclampsia.

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., Vidotto A., Polachini M., Henrique T., Marqui B., and Helena E. 2012. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Revista Da Associação Médica Brasileira (English Edition)*, 58(3), 366–375.
- Barh D., V. Z. 2013. Applications in biomedical, agricultural and environmental sciences. CRC Press Taylor and Francis group.
- Bogdanov B. and Smith 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 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
- Edman P. and Begg G. 1967. A protein sequenator. *European J Biochem.* 1 (1): 80-91.
- 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 W. 2006. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* 314: 109-112

Horgan P., Clancy H., Myers E., and Baker 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 J., Li H., Makarov A., Hardman M., and Cooks R.G. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40: 430-443.

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

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

Lubec G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzer M, Cairns N and Fountoulakis M, Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down syndrome and Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level, *J Neural Transm Suppl* 57, 161–177 (1999).

Maldonado A., and Jorriñ J. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. (pp. 1–16). Recuperado de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>

Morales D., and Gallo L. 2006. Plataformas de proteómica. Cuernavaca, Morelos. Instituto de biotecnología. UNAM. Recuperado de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf

Mouriño, M. C. 2008. Proteómica bottom-up y top-down de organismos poco secuenciados. Identificación de especies. 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 E., and Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering*, 18(5), 195–205. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16100742>

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

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

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

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

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

Sambrook J. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press.

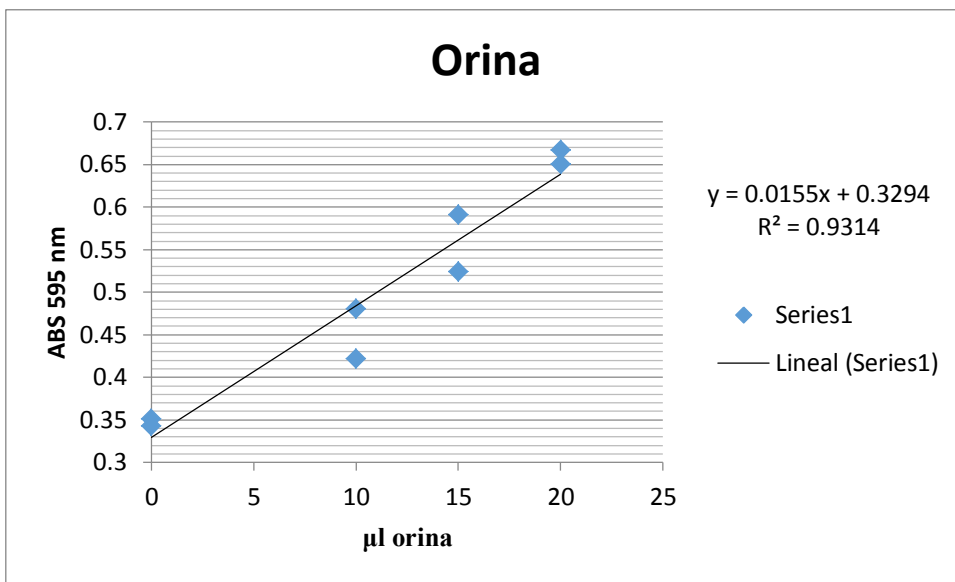
Schlatzer D., Maahs M., Chance R., Dazard E., Hazlett F., and Snell-Bergeon K. 2012. Novel urinary protein biomarkers predicting the development of microalbuminuria and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 35(3), 549–55.

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

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF and Williams KL, Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19–50 (1996)

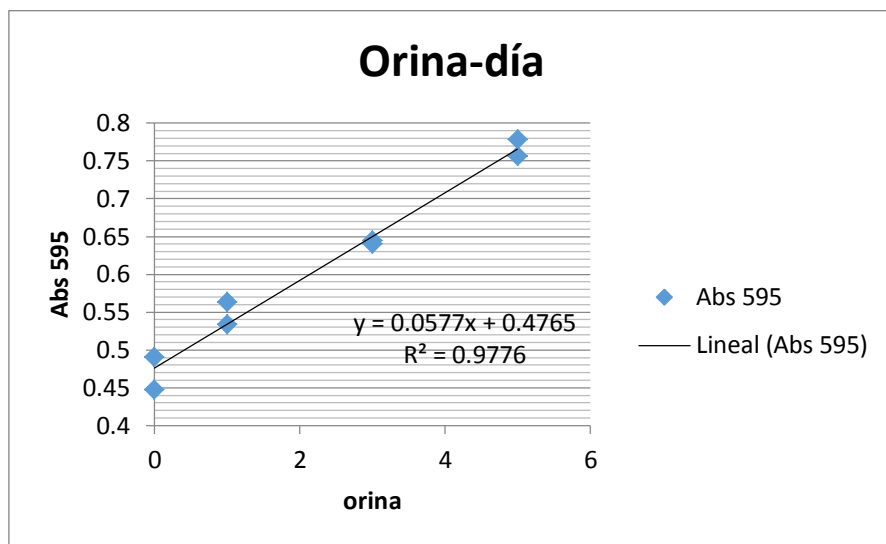
Wu C. and MacCoss J. 2002. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4: 242-250.

ANEXOS



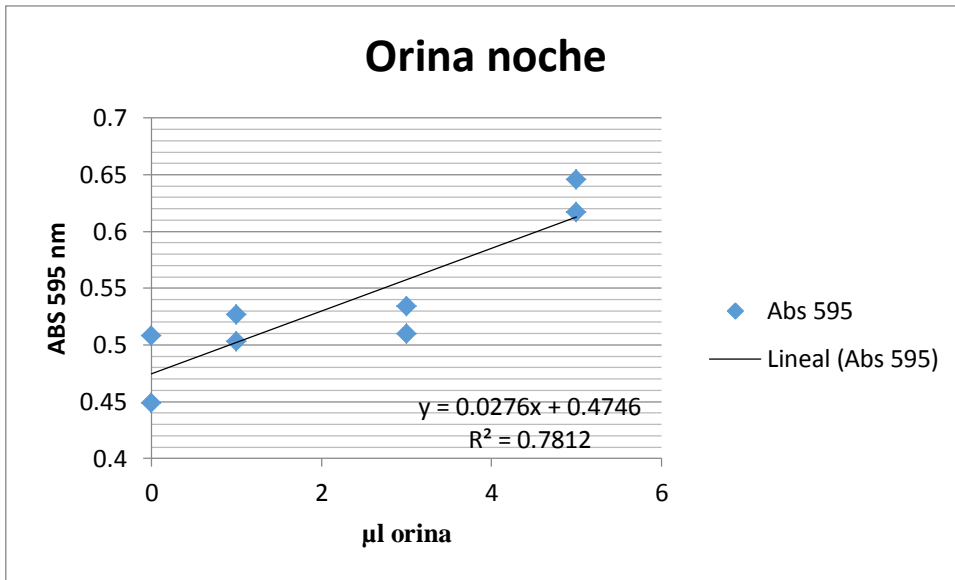
µl orina	ABS 595 nm
0	0.343
	0.351
10	0.480
	0.422
15	0.591
	0.524
20	0.650
	0.667

GRÁFICA 2 CURVA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN ORINA. ENSAYO 1



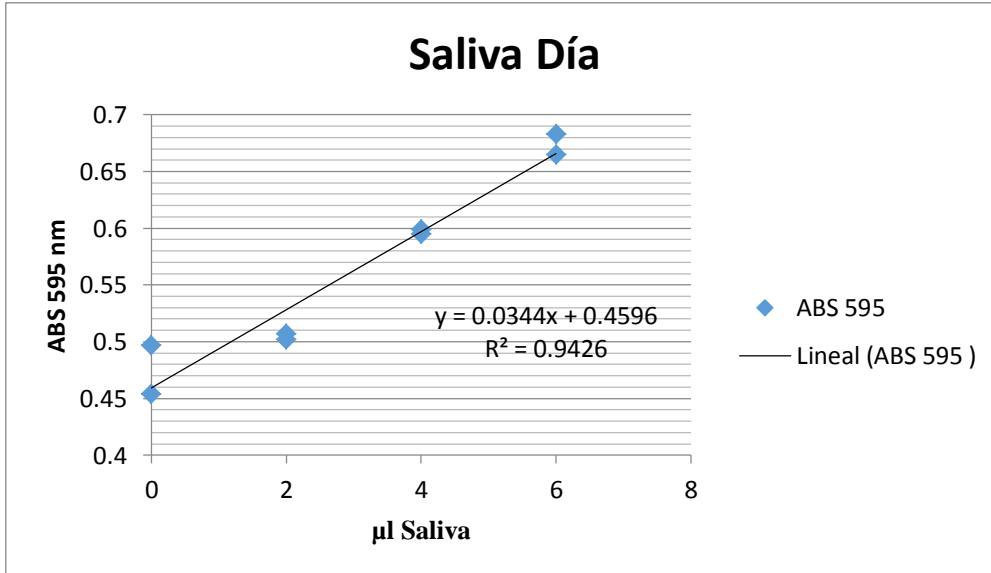
µl orina	ABS 595 nm
0	0.490
	0.447
1	0.533
	0.563
3	0.644
	0.640
5	0.756
	0.778

GRÁFICA 3 CURVA DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN ORINA-DÍA. ENSAYO 2



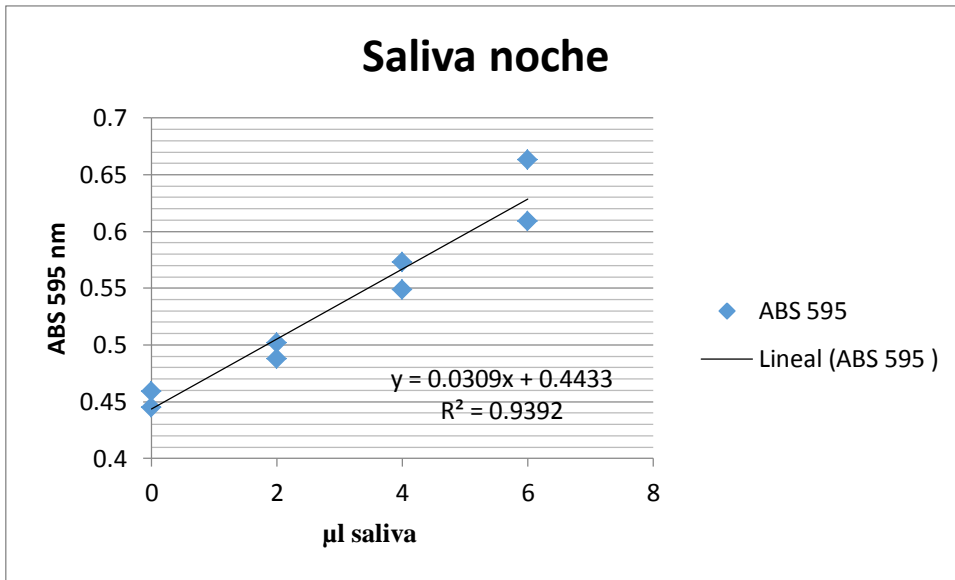
µl orina	Abs 595
0	0.508
	0.449
1	0.527
	0.503
3	0.534
	0.51
5	0.617
	0.646

GRÁFICA 4 CURVA DE CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS EN URINA-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 CUANTIFICACION 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