

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARÍA DE SALUD

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIURUGIA**

“MANUEL VELASCO SUAREZ”

**ANALISIS PROTEÓMICO DE ADENOMAS HIPOFISIARIOS
NO FUNCIONALES**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE

NEUROCIURUJANO

PRESENTA:

Dr. Arturo Sotomayor González

TUTOR DE TESIS: DRA. LESLY AMINTA PORTOCARRERO
ORTIZ

MEXICO, D.F. A 30 DE JULIO DEL 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COAUTORES

Dra. Lesly Aminta Portocarrero Ortiz
Endocrinóloga Adscrita a la Consulta
Externa
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía
“Manuel Velasco Suarez”

Dra. Alma Ortiz Plata
Adscrito en la unidad de patología
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía
“Manuel Velasco Suarez”

Dra. Febe Elena Cazares Raga
Departamento de Infectómica y
Patogénesis Molecular
CINVESTAV

Dr. Fidel Hernandez de la Cruz
Departamento de Infectómica y
Patogénesis Molecular
CINVESTAV

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

Dr. Nicasio Arriada Mendicoa
Director de Enseñanza
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

Dr. Juan Luis Gómez Amador
Subdirector de Neurocirugía
Profesor Titular del Curso de Neurocirugía
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

Dra. Lesly Aminta Portocarrero Ortiz
Endocrinóloga Adscrita a la Consulta Externa
Tutor de Tesis
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

Dr. Arturo Sotomayor González
Residente de Neurocirugía
Autor de tesis
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres quienes con su amor, enseñanza, apoyo y principios han hecho de mi persona un hombre de bien,

A Lupita, mí amada esposa, compañera, amiga y confidente. Gracias por tu paciencia y darme el tiempo para terminar con éxito este objetivo.

A mí amiga y tutora Dra. Lesly Portocarrero, por su apoyo y ser una parte fundamental de mi formación.

A el Dr. Juan Luis Gomez-Amador, por apoyarme y darme las herramientas para comenzar esta gran carrera.

ÍNDICE

1) Marco teórico e introducción	Pág. 6
2) Planteamiento del problema	Pág. 18
3) Hipótesis	Pág. 19
4) Objetivo	Pág. 19
5) Justificación	Pág. 20
6) Metodología	Pág. 21
7) Resultados	Pág. 27
8) Discusión	Pág. 38
9) Conclusión	Pág. 41
10) Bibliografía	Pág. 43

1)MARCO TEORICO E INTRODUCCIÓN

ADENOMAS HIPOFISIARIOS.

Los tumores pituitarios son lesiones que representan del 10 al 15% de todas las neoplasias intracraneanas del SNC. Los tumores pituitarios son la tercera causa más común de neoplasias primarias del SNC, en Estados Unidos de Norteamérica tienen una incidencia anual de 8.2 a 14.7 por 100,000 habitantes siendo la tercera causa de neoplasias primarias del SNC y la segunda en el Instituto. La causa más común de anomalía funcional pituitaria son los adenomas de hipófisis, los cuales pueden secretar hormonas o interferir en su producción y regulación.(1)

Los adenomas de hipófisis pueden aparecer en todos los grupos etarios, siendo la edad pico de su presentación entre la tercera y la sexta década de la vida. En general, los tumores funcionales tienden a ser más comunes en adultos jóvenes y las lesiones no productoras tienden a presentarse con mayor frecuencia en pacientes ancianos. Los tumores hipofisarios son menos comunes en la población pediátrica, representando sólo el 2% de las lesiones primarias del SNC. Se ha encontrado predisposición genética de tumores pituitarios en los pacientes con el síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN 1) tumores que corresponden solamente al 3 % de los tumores pituitarios (2).

Los adenomas de hipófisis se pueden clasificar en funcionales o no funcionales de acuerdo a su producción hormonal, los prolactinomas representan la variedad más común de tumores funcionales. Los adenomas no

funcionales pueden ser secretores de FSH o LH y no dar manifestaciones clínicas por su producción hormonal o ser verdaderamente tumores no secretores de hormonas.

En base a su tamaño los adenomas de hipófisis se clasifican en microadenomas si su tamaño es menor a 10 mm y en macroadenomas si su tamaño sobrepasa los 10 mm. Los tumores funcionales suelen ser microadenomas mientras que los no funcionales más comúnmente se manifiestan como macroadenomas (3).

ADENOMAS HIPOFISIARIOS NO FUNCIONALES

Los adenomas hipofisarios no funcionales son neoplasias en su mayoría benignas de la glándula pituitaria, representan el 30% de todos los adenomas hipofisarios. Se caracterizan por la aparente ausencia de producción hormonal, sin embargo; la inmunohistoquímica demuestra que la mayoría de los adenomas hipofisarios no funcionales están formados por células las cuales tienen producción activa de hormonas hipofisarias, solo 20-40% son negativos para la misma y se denominan adenomas de células nulas.

La forma de presentación de los adenomas no funcionales depende de su tamaño y frecuentemente se descubren a manera de hallazgos radiológicos. Cuando producen sintomatología va en relación al efecto de masa del tumor. Lo más comúnmente referido es la cefalea, defectos visuales asociados a compresión quiasmática como la hemianopsia bitemporal o cuadrantanopsias, deficiencias hormonales secundarias a compresión pituitaria las cuales son variables pero se manifiestan principalmente por la baja de TSH y ACTH. Otros síntomas menos comunes son la apoplejía

pituitaria, afección de nervios craneales y atrofia óptica (4).

El tratamiento de elección de los adenomas hipofisarios no funcionales es la exéresis quirúrgica. La principal indicación para cirugía es la afección de la función visual. Los principales objetivos de dicho procedimiento son la preservación o restauración de la función visual y el control del tumor a largo plazo. La cirugía ha probado mejorar la función visual en un 80% de pacientes. Existen otras modalidades de tratamiento como la radioterapia y el manejo médico con agonistas dopaminérgicos, las cuales se reservan para casos donde existen contraindicaciones para cirugía (Edad del paciente o comorbilidades), para cuando la resección quirúrgica no fue completa o para cuando existe recidiva del tumor y el paciente no acepta o es de alto riesgo una reintervención quirúrgica.

La radioterapia ha mostrado ser efectiva para el control de adenomas hipofisarios, existen 2 modalidades. Entre las principales complicaciones de la radioterapia están el pahnipopituitarismo secundario y la afección visual secundaria (5).

El tratamiento de los adenomas hipofisarios con agonistas dopaminérgicos ha permanecido en controversia durante los últimos años. En un principio se observó una ausencia de respuesta al manejo de estos tumores con agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina; sin embargo, con la aparición de la cabergolina se logró un efecto mucho más potente y existen estudios que reportan un control tumoral adecuado de estos tumores con el uso de dosis altas de cabergolina. En la actualidad la cabergolina es usada en algunos centros para el control y vigilancia de tumores

residuales o en pacientes que no aceptan cirugía. Existen otros estudios con análogos de somatostatina sin embargo su efectividad todavía está por comprobarse (6).

CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LOS ADENOMAS DE HIPOFISIS

La clasificación histopatológica antigua de los adenomas de hipófisis los agrupaba en tres categorías: acidófilos, basófilos y cromóforos. Los acidófilos, eran exclusivamente productores de hormona de crecimiento, los basófilos, productores de ACTH y los cromóforos, que no captaban medio de contraste, creyéndose que eran no productores. En la actualidad esta clasificación simplista fue ampliada con el advenimiento de la microscopía electrónica y las técnicas de inmunohistoquímica que han podido mejorar sustancialmente su valoración en cuanto a producción hormonal. Así se han establecido 14 subtipos de adenomas (Tabla 1). El grado de agresividad de los adenomas no se relaciona con cambios estructurales, a diferencia de lo que sucede con otras lesiones neoplásicas como los astrocitomas en los que el pleomorfismo, la atipia nuclear, el incremento en la celularidad y la actividad mitótica son parámetros de agresividad tumoral (7).

Tabla 1. Clasificación histopatológica y por inmunohistoquímica de los ADH

Tipo de adenoma	Frecuencia	T a s a H:M	C a r a c t e r i z a c i ó n inmunohistoquímica
Poco granulado PRL	27.0	1:2.5	PRL
Densamente granulado PRL	0.04	-	PRL
Densamente granulado GH	7.1	1:0.7	GH, subunidad α (PRL, TSH, LH, FSH)
Poco granulado GH	6.2	1:1.6	GH, PRL (subunidad α)
Mixto GH-PRL	3.5	1:1.1	GH, PRL (subunidad α , TSH)
Mamosomatotropo	1.2	1:1.1	GH, PRL (subunidad α , TSH)
Células acidofilas	1.6	1:1.5	PRL, GH
Adenoma corticotropo densamente granulado	9.6	1:5.4	ACTH (LH, subunidad α)
Adenoma corticotropo poco granulado	raro	-	ACTH
Adenoma del tirotripo	1.1	1:1.3	TSH (GH-PRL, subunidad α)
A d e n o m a gonadotrópico	9.8	1:0.8	FSH (LH, subunidad α , ACTH)
Corticotropo silente	4.9	1:1.3	ACTH, β -endotrofina)
No productor (nun cell)	12.4	1:0.7	Inmunonegativo
Oncocitomas	13.4	1:0.5	Inmunonegativo
No clasificable	1.8	-	-

Kovacs K, Horvath: Tumors of the pituitary gland, Atlas of tumor pathology, fascicle 21, 2nd series, Washington D.C. Armed forces institute of pathology .

Abreviaturas: PRL: prolactina, GH: Hormona de crecimiento, FSH: Hormona folículo estimulante, LH: Hormona Luteinisante, TSH: Hormona estimulante de tiroides.

MARCADORES PREDICTORES DE COMPORTAMIENTO DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS

Ya previamente han sido descritos múltiples indicadores que pueden ayudar a predecir el comportamiento de los adenomas de hipófisis. Un estudio publicado por Tella Junior y cols. encontraron que los adenomas bihormonales así como los productores de subunidad alfa eran mas invasivos que los otros tipos de adenomas. Otro estudio realizado por Schreiber y cols. mostró que en los adenomas de células nulas y en los oncocitomas existía una mayor presencia de Ki 67 mientras fueran mas invasivos. También encontraron positividad para p53 un porcentaje de los adenomas invasores. Hasta ahora la mayoría de los estudios están enfocados en describir la expresión y mutación de genes así como la descripción de algunos marcadores de agresividad tumoral.

La secuenciación del genoma humano (Lander, 2001), la generación de bases de datos de proteínas (Boguski, 2003) y los avances en la tecnología para estudiar los sistemas biológicos de una gran variedad de organismos (Matsumoto, 2009; Lockhart, 2000, Aebersold, 2003; Aebersold y Mann, 2003), han revolucionado la biología y la medicina. Las secuencias de DNA de distintos organismos están disponibles en las bases de datos, sin embargo, las secuencias de genes dan una información incompleta sobre las propiedades de las proteínas.

Las proteínas son las responsables de las funciones celulares ya que determinan la estructura y función de los organismos. Las proteínas se codifican a partir del ADN siendo copiado en ARN mensajero, éste a su vez llega a los ribosomas, donde con ayuda del ARN de

transferencia se codifica en la proteína para el cual esta diseñado.

Aunque la función del organismo y lo necesario para realizarla reside en el ADN, no todos los genes son codificados en proteínas. Además una proteína puede sufrir hasta 400 modificaciones postraduccionales, por lo que el resultado final no necesariamente es una copia fiel del gen a partir del cual fue codificada. Por esta razón, actualmente el análisis exhaustivo de secuencias también se está aplicando a todas las proteínas (proteoma) presentes en la célula, tejido u organismo completo en un momento particular. Este tipo de análisis ha confirmado que el proteoma es dinámico, que las proteínas cambian dependiendo del medio ambiente y estado fisiológico en que se encuentre el organismo y esta información está siendo aplicada a todos los campos de la biología y la medicina.

La proteómica es actualmente una tecnología de punta que se encarga de estudiar el conjunto de proteínas que constituyen a los organismos, tejidos o células, comparando dos o más estados diferentes (tejido sano y enfermo), identificando cambios en las proteínas tanto cualitativos como cuantitativos. La posibilidad de estudiar la proteómica de una célula deriva del avance en los mecanismos de espectrometría de masas lo que permite la identificación de las secuencias de aminoácidos en las proteínas de interés (7,8,9).

PROTEÓMICA Y ADENOMAS DE HIPOFISIS

Ya se han realizado algunos estudios los cuales tratan de dilucidar atlas de proteínas en adenomas de hipófisis, así como alteraciones en adenomas de hipófisis. Un estudio realizado por Liu y cols. identificó un total de 2243 proteínas las cuales caracterizan al prolactinoma,

siendo la base de datos más grande para este subtipo de adenomas (10). Moreno y cols. realizaron un estudio en el cual compararon adenomas hipofisarios no funcionales (n=11) contra 8 hipófisis normales (n=8), analizando la expresión de genes y el proteoma de dichos especímenes. En este trabajo se identificó que en los adenomas existían 115 puntos sobre-expresados y 169 suprimidos, en cuanto a la proteómica encontraron 21 proteínas sobrerreguladas y 29 proteínas subreguladas (Figura) (11).

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

El primer paso para poder analizar las proteínas de un grupo de células consiste en aislar las proteínas. Para ésto se emplea la electroforesis de proteínas en geles bidimensionales de poliacrilamida (2D-PAGE). En la primera dimensión las proteínas son separadas por carga viajando hasta que estas alcanzan su punto isoeléctrico. En la segunda parte las proteínas son separadas por electroforesis en presencia de duodecil sulfato de sodio en basa a la masa molecular de las macromoléculas. Una vez que son obtenidas y separadas las proteínas del tejido se procederá entonces al análisis del proteoma.

Para la determinación de las proteínas de un gel se analiza la muestra de estudio con la técnica de electroforesis bidimensional de proteínas.

1. Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), 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. 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 isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

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.

$$V = q E / f$$

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 porque 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 isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

2. Métodos electroforéticos zonales

Son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución de tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente. Como soportes han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa, acetato de celulosa, etcétera.

Este método tiene gran poder resolutivo porque se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple (fuente de poder y cubeta vertical u

horizontal donde se coloca el soporte y 2 electrodos). Con el desarrollo de la ciencia se han diseñado equipos automatizados de electroforesis.

2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

Isoelectroenfoque.

El equipo IP consiste en un sistema de electroforesis computarizado, en el cual se puede ejecutar focalización isoeléctrica, electroforesis y revelar éstas automatizadamente. Los geles de electroforesis denominados PhastGel, empleados en el equipo PhastSystem, tanto para sistema nativo como desnaturalizado emplean como tampón acetato 0,112 mol/L y tris 0,112 mol/L a pH 6,4 en ambas zonas. Las longitudes de los geles concentrador y separador son de 13 y 32 mm respectivamente y su grosor de 0,45 mm.

El tampón de electrodo se suministra en forma de tiras de 2 tipos, uno para electroforesis nativa y otro para desnaturalizada, hechos con reactivos de alta calidad y agarosa de baja electroendósmosis. Estas crean durante la corrida un sistema de tampón discontinuo o continuo según se desee. En las tiras para SDS-PAGE se emplea tricina 0,2 mol/L, tris 0,2 mol/L, SDS 0,55 %

pH 8,1, agarosa 2 %. Esta alta concentración de SDS en las tiras permite eliminar el SDS del gel.

El PAGE-nativo en equipo PhastSystem emplea los mismos geles que el desnaturalizado, solo cambia el sistema de tampón en las tiras, que es en este caso de L-alanina 0,88 mol/L y tris 0,25 mol/L pH 8,8 en agarosa 2 % (acetato como iones líderes y L-alanina como rezagados). Como el pH del gel toma un valor de 8,8, las proteínas con punto isoelectrico menor que 8,3 se cargan negativamente y migran a través de la zona de concentración (12, 13).

2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce la totalidad de proteínas, las cuales se expresan en adenomas hipofisarios no funcionales y que no se expresan en células hipofisarias normales en población Mexicana.

3) HIPOTESIS

Existen diferencias en el análisis proteómico de los adenomas hipofisarios no funcionales y las células hipofisarias normales, las cuales pueden condicionar el desarrollo de estos tumores.

4) OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el perfil de expresión proteico de los adenomas hipofisarios no funcionales, con electroforesis bidimensional, comparando por confrontación los geles con el mapa proteómico hipofisario. En población mexicana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener el perfil proteómico de los adenomas hipofisarios no funcionales.
2. Analizar la diferencia entre la proteomica de los adenomas hipofisarios no funcionales de acuerdo a epidemiologia y características de imagen.
3. Identificar las proteínas expresadas, comparando los mapas con el mapa de células hipofisarias normales.

5) JUSTIFICACION

Los adenomas hipofisarios son un grupo heterogéneo de neoplasias que se manifiestan con diversos signos y síntomas debido a su estirpe celular; ésto hace de ellos un tipo complicado de neoplasias que ha sido difícil de entender y por lo tanto de tratar. A pesar de considerarse como tumores benignos existen casos agresivos, que pueden ser altamente invasores y recurrentes y en raras ocasiones, tener metástasis, en caso de los carcinomas. Los adenomas hipofisarios causan morbilidad significativa debido a su localización anatómica crítica, su capacidad de expansión tumoral y a las alteraciones endócrinas. Aunque se han realizado diversas investigaciones para tratar de comprender su comportamiento, no se han encontrado datos claros que relacionen su comportamiento con los hallazgos histopatológicos, ni los mecanismos moleculares involucrados en su formación. Debido a esto se pretende aplicar la estrategia del análisis proteómico para conocer el patrón de expresión de los adenomas hipofisarios no funcionales.

Los resultados que se obtengan con el presente trabajo, contribuirán al conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de los adenomas hipofisarios.

6) METODOLOGIA

DISEÑO

Se realizó un estudio transversal, prospectivo en el cual se incluyeron pacientes que ingresaron al servicio de Neurocirugía para exéresis de lesiones de la región selar; a esta población se le tomó una muestra de tumor la cual se congeló de inmediato a -70° C. Una vez reunidos un número de 18 pacientes con diagnóstico histopatológico de adenomas hipofisarios no funcionales. Una vez obtenidas las muestras se procesaron para la extracción de proteínas, obtención de los geles bidimensionales y análisis de grupos para identificar diferencias comparándolos entre sí y con el mapa proteómico ya descrito previamente de células hipofisarias normales.

Se compararon los resultados en base a género e imagen de resonancia magnética, clasificándolos como invasores si presentaban al menos uno de los siguientes datos radiológicos: Invasión al seno cavernoso, parenquima cerebral y/o III ventrículo.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Mujeres y hombres mayores de 18 años que fueron sometidos a exéresis de la lesión en el servicio de neurocirugía del INNN; cuyo resultado de histopatología fue el de adenoma hipofisario no funcionales.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL ESTUDIO

- 1.- Hombres y mujeres.
- 2.- Edad: mayores de 18.
- 3.- Adenoma hipofisario no funcionales diagnosticado por análisis histopatológico.
- 4.- Contar con estudios de resonancia magnética.

CRITERIOS DE ELIMINACION DEL ESTUDIO

- 1.- Apoplejía pituitaria.
- 2.- Pacientes cuyo resultado del estudio histopatológico sea el de un tumor funcionales u otro diagnóstico histopatológico.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Cada muestra de tejido de adenoma de hipófisis o de hipófisis sana, será sometida al siguiente procedimiento.

El material fue dividido en dos partes, una de las cuales fue procesada para fijación en formalina e inclusión en parafina, para realizar los cortes histológicos necesarios para las técnicas de hematoxilina y eosina, para el diagnóstico histopatológico de rutina, y para la técnica de inmunohistoquímica, aplicando anticuerpos específicos contra las hormonas adenohipofisarias.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

A las muestras se les agregó buffer de muestra para isoelectroenfoque [urea 7 M (Bio-Rad, EUA), tiourea 2 M (GE Healthcare, Suecia), CHAPS 4%(Roche, EUA), IPG buffer 2% (GE Healthcare, Suecia), DTT 40 mM (Invitrogen, EUA) en agua Milli-Q]; un cóctel de inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche EUA) y un cóctel de inhibidores de fosfatasas (PhosStop, Roche Alemania); inhibidores de endonucleasas [1µl de EDTA 1 mM (Invitrogen, EUA); EGTA 1 mM (Sigma, EUA) pH 8.0. Posteriormente los tejidos fueron lavados por medio de centrifugación, precipitando cada vez con el Kit comercial 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, EUA).

Las pastillas de proteínas lavadas, se disolvieron en buffer de muestra para isoelectroenfoque junto con solución de hidratación para isoelectroenfoque [urea 7 M (Bio-Rad, EUA), tiourea 2 M (GE Healthcare, Suecia), CHAPS 4% (Roche, EUA), IPG buffer 0.5% (GE Healthcare, Suecia), DTT 40 mM (Invitrogen, EUA) en agua Milli-Q] y se realizaron lavados adicionales (Person, 2006) con metanol 100% y cloroformo para terminar de purificar las proteínas.

Las proteínas purificadas se disolvieron en solución de hidratación para isoelectroenfoque, nuevamente se agregaron inhibidores de proteasas y de fosfatasas, 1µl de EDTA 1mM y 1µl de EGTA 1mM pH 8.0. Las proteínas se cuantificaron usando un método comercial (2-D Quant Kit, Amersham Biosciences, EUA). A las

muestras se les ajustó el volumen con solución de hidratación y se les agrego 2µg de azul de Bromofenol 0.002% (Bio-Rad, EUA) como indicador de pH en la migración de las proteínas en el isoelectroenfoque.

Las proteínas se analizaron por E2D. En la primera dimensión en una cámara de electroforesis (IPGPHOR, GE) para tiras pre-hechas (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) y por PAGE-SDS al 12% en la segunda dimensión. Los se tiñieron con azul de Coomassie, fueron analizados (14)

ANALISIS DE LOS GELES BIDIMENSIONALES

Los geles bidimensionales se digitalizaron y analizaron cuantitativamente y cualitativamente utilizando un software para análisis de imágenes Melanie 6.0 (Genebio, Geneva Bioinformatics SA. Los resultados se agruparon de acuerdo a si se trataban de adenomas hipofisarios e hipófisis normales.

ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

De cada biopsia incluida en parafina, se elaboraron cortes de 4 µm de grosor, los cuales se montaron en laminillas con poli-L-lisina. Posteriormente se les desparafinó en xilol con cambios de 15 minutos, se hidrataron en una serie de soluciones de alcohol de concentraciones graduales descendentes (OH absoluto,

96%, 80% y 70%,) en baños de 3 minutos cada uno, hasta agua destilada. Se realizó recuperación antigénica en una olla de presión por 1 minuto, colocando las laminillas en un baso Copplin de plástico con tapa con la solución recuperadora Diva Decloaker (Biocare Medical, LLC. Concord, CA. USA). Después de que bajó la presión la olla, las laminillas se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ por 15 minutos (400 µl de H₂O₂ al 30 % en 50 ml de agua destilada) y se lavaron con agua destilada; se enjuagaron en PBS por 3 minutos y se bloquearon los sitios antigénicos inespecíficos con un bloqueador comercial (BioCare Medical). Se realizaron 2 lavados de 3 minutos en PBS-tritón 0.1% (Triton X-100 Sigma Aldrich, St.Louis) y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-ACTH (1:50; Dako, Carpintería California), D2DR (1:150, GENTEX, Biocare Medical) por 1 h; después de 2 enjuagues con PBS-tritón por 3 minutos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinado (4+Biotinylated Universal Goat, Bio Care Medical) por 30 minutos y se lavaron; a continuación se incubó con el marcador de streptavidina (4+ Streptavidin HRP Label, BioCare Medical) por 30 min. Por último se reveló la reacción con el kit de DAB (diaminobencidina, Dako Cytomation; carpintería, California) por 5 minutos y se enjuagaron en agua destilada durante 5 minutos.

Para el contraste se utilizó hematoxilina por 2 minutos, se enjuagó en agua corriente y se viró en carbonato de litio por 10 segundos. Para finalizar se deshidrataron en

alcohol al 70%, 80%, 96%, y absoluto (2 tiempos), OH-xilol y xilol, para después montar las laminillas con cubreobjetos con resina (Entellán Electron Microscopy Sciences), para su observación al microscopio de luz (Olympus BH2).

ANÁLISIS POR CONFRONTACIÓN DE GELES

La confrontación de geles ha sido una técnica ya previamente descrita y usada para distintas publicaciones en materia de proteómica (15). Con este método se comparan los geles obtenidos en nuestro trabajo, con mapas proteómicos de otras muestras y de lo ya previamente publicado por otros autores. Al momento existen bases de mapas proteómicos disponibles para la comparación, además del proteoma de hipófisis ya descrito por Desiderio y colaboradores (16).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa Image 2D platinum para la evaluación de la volumetría de las manchas y la U de Mann-Whitney para comparar los datos numéricos de las muestras en base a los grupos previamente descritos.

7) RESULTADOS

Se incluyeron 18 sujetos con diagnóstico de adenomas hipofisarios no funcionales, uno de los pacientes se

excluyo al identificarse en el estudio de patología como tumor productor de TSH, se incluyen para el análisis solo 17 pacientes, sus tejidos se procesaron con la técnica previamente descrita y se obtuvieron purificados proteicos, los cuales sirvieron para someterlos a electroforesis de proteínas y posteriormente obtener el gel bidimensional de poliacrilamida. Se procesó la muestra para obtener 1 o dos geles dependiendo la cantidad de muestra disponible para procesamiento. A continuación se detalla en la siguiente tabla las características de la población en estudio.

Tabla 1. A continuación se muestran características básicas de las muestras estudiadas.

Paciente	ID	Sexo	Tipo Tumor	IRM	Geles Procesados
1	FGV	M	NF	Si	2
2	MPG	F	NF	Si	2
3	LRR	M	NF	Si	2
4	DMC	F	NF	Si	1
5	JRC	F	NF	Si	1
6	HRB	M	NF	Si	1
7	RJC	M	NF	Si	1
8	OFO	M	TSH	Si	1
9	MRB	M	NF	Si	2

Paciente	ID	Sexo	Tipo Tumor	IRM	Geles Procesados
10	HGM	M	NF	Si	2
11	MFC	F	NF	Si	1
12	DRO	M	NF	Si	1
13	EHG	F	NF	Si	2
14	LMV	F	NF	Si	2
15	ECH	M	NF	Si	2
16	MSO	M	NF	Si	2
17	AVR	M	NF	Si	2
18	OSA	F	NF	Si	2

Tabla 2. Características por inmunohistoquímica de las muestras empleadas en este estudio.

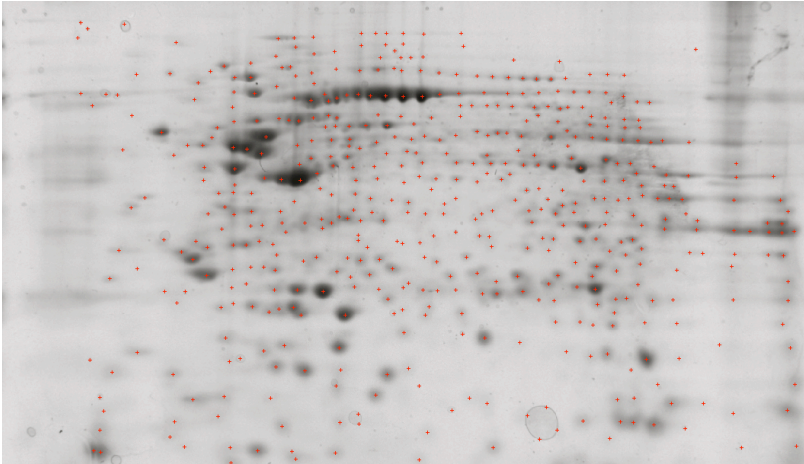
	PrI	HC	FSH	LH	TSH	ACTH	Clasificación
1	0	0	+++	+	0	0	Gonadótropo
2	0	0	0	0	0	0	Adenoma Nulo
3	0	0	++	0	0	0	Gonadótropo
4	0	++	0	0	0	0	Somatotropo S
5	0	0	0	0	0	0	Adenoma Nulo
6	0	0	+	0	0	0	Gonadótropo
7	0	0	+++	0	0	0	Gonadótropo

	PrI	HC	FSH	LH	TSH	ACTH	Clasificación
8	0	0	++	0	++	0	Oncocitoma
9	0	0	+	0	0	++	Mixto Silente
10	0	++	0	0	0	0	Somatotropo S
11	0	0	+	+	0	0	Gonadótropo
12	0	0	+	0	0	0	Gonadótropo
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
14	0	0	+++	0	0	0	Gonadótropo
15	0	0	++	0	0	0	Gonadótropo
16	0	0	++	0	0	0	Gonadótropo
17	0	0	0	0	0	0	Adenoma Nulo.
18	0	0	++	0	0	0	Gonadótropo

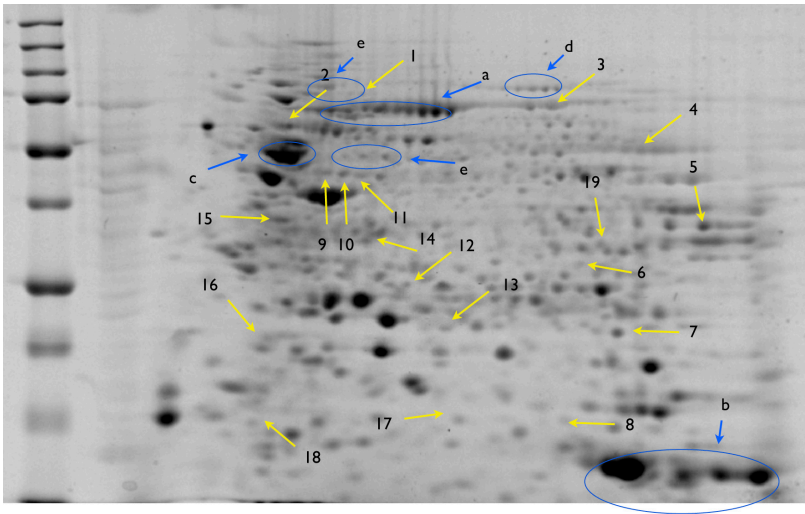
Gel Maestro e identificación del proteoma

De los geles procesados se identificaron los 4 geles que presentaran la mejor definición y se emplearon para la realización de un gel maestro estandarizando las manchas en los 4 geles y solo se incluyen como marcadas con punto rojo las manchas que fueran coincidentes entre los 4 geles. A continuación se muestra uno de los geles con la superposición en cruces rojas de las manchas identificadas en los 4 geles.

Figura 1. Gel maestro del mapa proteómico de un adenoma hipofisiario no funcionales. Se muestran en rojo las manchas que fueron coincidentes en 4 muestras diferentes de adenomas de hipofisis no funcionales



Para realizar la confrontación de los geles se utilizó el mapa proteómico publicado por Desiderio y colaboradores del proteoma de la célula de adenohipofisis normal y los mapas proteómicos de células de hepatoblastoma y líquido cefalorraquídeo para la identificación de proteínas séricas que no se detallaban en los mapas de adenohipofisis.



Mapa proteómico de Adenoma de hipófisis no funcionales con identificación de 6 proteínas e isoformas del suero y 19 proteínas correspondientes al ADH. Se muestran en la siguiente tabla.

PROTEINA	MARCA
Albumina Humana	a
Inmunoglobulina de cadena ligera	b
Alfa1- antitripsina	c
Serotransferrina	d
Fibrinogeno	e
Cadena 1 de Hemopexina	1
Inhibidor de Proteasa alfa-1	2

PROTEINA	MARCA
Proteina no identificada	3
Proteina de union a GTP	4
Zinc finger protein 271	5
Ret finger protein like 3	6
Chain 1 of insulin-like growth factor binding	7
Proteina no identificada	8
Cadena 1 de albumina sérica	9
Cadena 1 de albumina sérica	10
Chain 1 of 78-kDa glucose-regulated protein	11
Cadena 1 de somatotropina	12
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	13
Cadena 1 de actina	14
Anticuagulante vascular alfa	15
Cadena 1 de folistatina	16

PROTEINA	MARCA
ATP-binding protein associated with cell differentiation (protein 1-4)	17
ICEg-like apoptotic protease 5 (MORT1-associated CED-3 homolog; apoptotic cysteine protease; apoptotic protease Mch-5)	18
Isoforma 3 de Caldesmona	19

Análisis cuantitativo de expresión proteica.

Para realizar el análisis cuantitativo de la expresión proteica se uso el programa Image 2D Platinum. Mediante este programa se digitalizaron los geles, se realizó el gel maestro y se compararon en intensidad las distintas manchas. A continuación se muestran las zonas que se emplearon para análisis cuantitativo y estadístico considerando las zonas mas representativas de los geles (Figura 3).

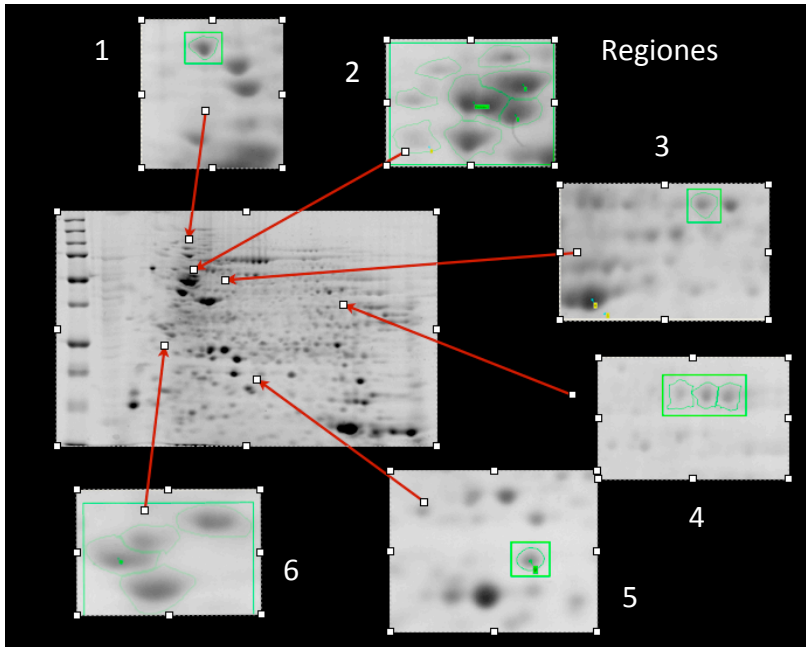


Figura 3. Se muestran las regiones de manchas que fueron analizadas con el Image 2D Platinum

Para su análisis se formaron grupos en base al sexo de los pacientes analizando masculino contra femenino y al grado de agresividad de los tumores en base a si presentan datos radiológicos de invasividad o no.

Criterios de invasividad: Invasión al parénquima cerebral, seno cavernoso y/o III ventrículo.

Se compararon masculino (n=10) vs. femenino (n=7) e invasores (n=7) vs. no invasores (n=10).

RESULTADOS POR REGIONES.

A continuación se muestra el análisis de volumetría de las manchas estudiadas. El programa Image2D Platinum asigna un número a cada mancha el cual se muestra en la primera columna. El valor dado a cada mancha está expresado en volumen, el cual es la suma de la intensidad de los píxeles dentro de los límites de la mancha (Vol= intensidad de píxeles de la mancha - intensidad de píxeles del gel). Esta es la manera estándar de asignarle un valor a cada mancha en estudios de proteómica usando geles de poliacrilamida.

Región 1

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	8.6	9.4	0.9	6.4	9.3	0.2
1	12.5	13.8	0.8	15.2	12.5	0.6
2	7.2	5.8	0.5	8.2	4.7	0.01

Región 2

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	25.3	16.5	0.08	1.7	2.3	0.7
1	3.5	3.6	0.9	4.2	3.0	0.3
2	2.9	2.3	0.7	3.8	3.4	0.9
3	0.2	0.19	0.9	0.24	0.33	0.9
4	2.6	3.3	0.3	0.51	1.1	0.5

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
5	0.22	0.25	0.9	2.4	1.6	0.2
6	1.4	2.5	0.2	0.35	0.19	0.5
7	0.13	0.06	0.8	3.4	3.3	0.9

Región 3

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	10.3	11.4	0.8	7.9	13.3	0.15
1	22.4	22.8	0.9	19.9	26.4	0.3
2	15	13.9	0.9	14.4	13.4	0.97
3	7.6	3.2	0.2	7.4	3.0	0.21
4	3.5	3.08	0.9	3.6	3.5	0.99
5	6.2	5.3	0.8	5.8	5.2	0.96
6	14.1	10.1	0.3	11.4	15.4	0.32
7	3.5	5.4	0.1	5.3	4.4	0.74

Región 4

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	3.8	4.5	0.6	4.2	4.0	0.9
1	5.9	6.4	0.8	6.4	5.9	0.8

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
2	7.1	5.9	0.5	7.1	6.9	0.9

Región 5

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	0.32	0.15	0.4	0.9	1.5	0.09
1	1.4	1.7	0.6	1.4	1.6	0.7
2	2.9	2.3	0.7	0.30	0.19	0.6

Región 6

Proteína	Hombres Vol	Mujeres Vol	p=	Invasores Vol	No-Inv Vol	p=
0	16.7	14	0.5	14.3	16.3	0.8
1	12.8	9.0	0.3	14.6	8.2	0.1
2	22.5	23.3	0.9	17.7	27.3	0.1
3	10.9	6.2	0.2	6.4	13.3	0.1

Todas las proteínas las cuales se compararon en los distintos subgrupos mostraron tener un comportamiento similar a excepción de la mancha que se muestra en la región 1 y en la figura 6. Esta aun no se identifica en los estudios previos de espectrometría de masas, sin embargo, se muestra su presencia en casi el doble de volumen en los tumores invasores en comparación con los no invasores.

DISCUSIÓN

Durante los años 70 se hicieron populares 2 técnicas para la identificación de proteínas, la técnica básica de Laemmli o electroforesis zonal (17), y la técnica de isoelectroenfoque o también llamada técnica de Gronow y Griffith (18), estas técnicas están basadas en principios completamente distintos, la primera separa las proteínas en base a su peso molecular y la segunda en base a su punto isoelectrónico. Desde ese tiempo se han buscado técnicas que mejoren la precisión y la cantidad de proteínas que es posible identificar en una muestra, es por eso que se busco juntar esas dos técnicas para producir mejores resultados y finalmente se llego a la técnica actual, llamada técnica de O`Farrel con la cual se permite identificar cientos de manchas en un gel las cuales se pueden caracterizar para detectar los componentes proteicos de una muestra (19). Esta técnica usa primero varias preparaciones para purificar la muestra para finalmente correr un isoelectroenfoque y separar las proteínas por su punto isoelectrónico; después la separación por peso molecular mostrando el resultado en dos dimensiones en el producto final que es el gel de poliacrilamida, esta nueva posibilidad llevo a la creación del proyecto del proteoma humano en el 2010.

Sin embargo, la proteómica es considerada una ciencia emergente y aun con mucho campo por explorar, hasta hace unos años todos los esfuerzos estaban concentrados en el proyecto del genoma humano, esto en parte por la importancia y popularidad del código genético así como por la dificultad para la adecuada identificación de las proteínas; ya con los avances en la espectrometría de masas y la identificación del genoma de distintas especies, se tomo importancia a los cambios que puede sufrir una molécula una vez que el ADN se

transforma en ARN y se ensambla la proteína, ya que se estima que pueden llegar a sufrir mas de 400 modificaciones postranslacionales antes de que esa proteína llegue a su producto final; esto hace necesario identificar no solo el gen encargado de producir una proteína sino también al producto del mismo y así identificar en donde puede estar el error responsable de una patología (20).

A diferencia del código genético el cual es igual en todas las células de un organismo, la proteómica es única de cada grupo celular y varia de manera considerable de acuerdo al tipo y estado en el que se encuentre la célula; y obviamente de si esta célula se encuentra sana o se encuentra enferma, es por eso que es indispensable la descripción del perfil proteómico de cada grupo celular normal y anormal en un organismo y esto a su vez en todos los organismos (21). En cuanto a los estudios en glándula hipófisis pocos grupos se han dedicado al estudio de la proteómica tanto en células normales como en tumores. Dominic Desiderio en la universidad de Tenesse empezó en el 2003 con su publicación de la identificación parcial del proteoma de adenomas hipofisarios no funcionales, para este trabajo empleo muestra de un solo tumor en el cual se generaron 4 replicas técnicas, una vez obtenido el mapa del proteoma se pudieron identificar mas de 900 manchas, estas fueron analizadas por espectrometría de masas logrando caracterizar 111 proteínas (22), simultáneamente publica la identificación del proteoma de células de adenohipofisis. Aquí se analizaron muestras de autopsia de 8 sujetos diferentes en los cuales se lograron identificar mas de 1000 manchas proteicas y 51 proteínas las cuales difieren en concentración de acuerdo a sexo, grupo racial y edad.

Consideramos este trabajo de gran importancia ya que representa una nueva línea de investigación en el país, mediante el cual se permitió estandarizar la técnica de purificación de muestra, técnica que puede variar de acuerdo a las propiedades de los tejidos; además se comenzó con la identificación de las primeras proteínas en los adenomas hipofisarios no funcionales. El proceso de estudio de cada mancha conlleva un trabajo importante y es necesario identificar tantas manchas como sean posibles y contribuir de esa manera con las bases mundiales del proteoma humano.

De las proteínas y sus isoformas identificadas en nuestros geles, la albúmina humana ha sido ampliamente estudiada y sobra en este trabajo ahondar más en la misma (15). La segunda proteína corresponde a las isoformas de la alfa 1 antitripsina, esta es un inhibidor de proteasa sérica la cual está formada por 394 aminoácidos y tiene su origen en el brazo largo del cromosoma 14. Su función principal es proteger a los tejidos de las proteasas presentes en las células inflamatorias, tiene una función de radical importancia en el pulmón donde protege a las células de la acción de la elastasa. Su deficiencia está asociada a enfisema pulmonar y cirrosis hepática. Es considerada una proteína del suero. La siguiente proteína es la transferrina la cual es ampliamente conocida como una beta 2 globulina; siendo su principal función unir el hierro en forma férrica. También es considerada una proteína del plasma. La tercera proteína es la cadena gamma del fibrinógeno, este es el precursor de la fibrina y está formado por dos cadenas alfa, 2 beta y 2 gamma, es una proteína sérica. La cuarta proteína representan cadenas ligeras de inmunoglobulinas y son partes polipeptídicas de inmunoglobulinas, también proteínas séricas.

La hemopexina es una proteína sérica encargada de fijar y transportar el grupo hem de la hemoglobina hacia el hígado, es considerada una globulina.

Las proteínas correspondientes a tejido tumoral tienen múltiples funciones en los mecanismos de función celular.

En cuanto a las proteínas correspondientes al suero, podría pensarse no corresponden a los objetivos del trabajo, sin embargo estas proteínas van a salir en mayor o menor cantidad en todos los mapas proteómicos de estos tumores, por lo que es importante conocer su ubicación en base a peso molecular y punto isoeléctrico para facilitar la lectura del gel así como para priorizar otras proteínas para su identificación las cuales si pudieran estar relacionadas directamente con el adenoma hipofisiario.

De las manchas comparadas por volumetría solo se encontró diferencia en una mancha la cual aun no esta identificada en espectrometría de masas. Se decidió no dividir los grupos por diferencias en los resultados de inmunohistoquímica debido a la existencia de múltiples grupos y a que son pocos sujetos agrupados en cada uno de los subtipos restando validez a una comparación estadística.

CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se inicia una nueva línea de investigación en este país en el estudio del proteoma en neoplasias intracraneales.

Se creó un gel maestro con la identificación de más de 250 manchas en diferentes muestras de adenomas hipofisarios no funcionales.

Se han logrado identificar mediante técnica de comparación de geles múltiples proteínas y sus isoformas correspondientes a proteínas séricas y de adenoma de hipófisis.

Las proteínas identificadas sirven para descartar proteínas a identificar al momento de reproducir geles y estudiar sus manchas con espectrometría de masas

Se debe continuar esta línea de investigación y completar el perfil proteómico para confirmar lo descrito en ese trabajo.

10) BIBLIOGRAFÍA

1. Cury, M., Fernandes, J., Machado, H., Elias, L., Moreira, A., & Castro, M. (2009). Non-functioning pituitary adenomas: clinical feature, laboratorial and imaging assessment, therapeutic management and outcome. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* , 53 (1), 31-9.
2. Beckers, A., & Daly, A. (2007). The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* , 157 (4), 371-82.
3. Greenman, Y., & Stern, N. (2009). Non-functioning pituitary adenomas. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* , 23 (5), 625-38.
4. Iwasaki, Y. (2011). [Pathophysiology and clinical features of non-functioning pituitary adenoma]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* , 69 Suppl 2, 138-41.
5. Jaffe, C. (2006). Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* , 9 (4), 317-21.
6. Colao, A., Di Somma, C., Pivonello, R., Faggiano, A., Lombardi, G., & Savastano, S. (2008). Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocrine-related cancer* , 15 (4), 905-15.
7. Salehi, F., Agur, A., Scheithauer, B., Kovacs, K., Lloyd, R., & Cusimano, M. (2010). Biomarkers of Pituitary

Neoplasms: A Review (Part II). *Neurosurgery* , 67 (6), 1790-1798.

8. Salehi, F., Agur, A., Scheithauer, B., Kovacs, K., Lloyd, R., & Cusimano, M. (2009). Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I. *Neurosurgery* , 65 (3), 429-37; discussion 437.

9. Suhardja, A., Kovacs, K., & Rutka, J. (1999). Molecular pathogenesis of pituitary adenomas: a review. *Acta neurochirurgica* , 141 (7), 729-36.

10. Liu, Y., Wu, J., Yan, G., Hou, R., Zhuang, D., Chen, L., et al. (2010). Proteomic analysis of prolactinoma cells by immuno-laser capture microdissection combined with online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry. *Proteome science* 8, 2.

11. Moreno, C., Evans, C.-O., Zhan, X., Okor, M., Desiderio, D., & Oyesiku, N. (2005). Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Research* , 65 (22), 10214-22.

12. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., et al. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* , 21 (6), 1037-53.

13. Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* , 4 (12), 3665-85.

14. Rabilloud, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* , 74 (10), 1829-41.
15. Hochstrasser, D., Frutiger, S., Paquet, N., Bairoch, A., Ravier, F., Pasquali, C., et al. (1992). Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis* , 13 (12), 992-1001.
16. Zhan, X., & Desiderio, D. (2003). A reference map of a human pituitary adenoma proteome. *PROTEOMICS* , 3 (5), 699-713.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680–5.
18. Gronow M, Griffith G. Rapid isolation and separation of non-histone proteins of rat liver nuclei. *FEBS Lett* 1971;15:340–4.
19. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007–
20. Gwinn-Hardy, K. (2004). Genomics-Proteomics and Stroke: Introduction. *Stroke; a journal of cerebral circulation* , 35 (11_suppl_1), 2731-2734.
21. Jagannathan, J., Li, J., Szerlip, N., Vortmeyer, A., Lonser, R., Oldfield, E., et al. (2009). Application and implementation of selective tissue microdissection and proteomic profiling in neurological disease. *Neurosurgery* , 64 (1), 4-14; discussion 14.

22. Zhan, X., & Desiderio, D. (2003). A reference map of a human pituitary adenoma proteome. *PROTEOMICS* , 3 (5), 699-713.