



Universidad Nacional Autónoma de México

UNAM
POSGRADO

**POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE VARIACIONES EN EL PROTEOMA SALIVAL
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON RABDOMIOSARCOMA
MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

C.D. DAVID SALOMÓN DOZAL DOMÍNGUEZ

DIRECTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

ASESORES: DR. ALBERTO OLAYA VARGAS

DRA. ROCÍO CÁRDENAS CARDOS

DR. HORACIO REYES VIVAS



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.

Índice

Abreviaturas	i)
Resumen español	ii)
Resumen inglés	iii)
Introducción	1
Antecedentes	2
Biomarcadores y su aplicación en la medicina	2
Saliva	4
Fisiología salival	5
Fisiopatología salival	6
Proteómica	7
Proteómica de fluidos	8
Electroforesis	9
Electroforesis bidimensional	10
Rabdomiosarcoma	13
Planteamiento del problema	19
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Tipo de estudio	20
Materiales y métodos	21
Criterios de inclusión y exclusión	22
Criterios de eliminación	23

Metodología	25
Selección de pacientes	25
Colección de muestra	25
Preparación de muestra	26
Electroforesis bidimensional (2-DE)	27
Análisis de los patrones de proteínas en 2-DE	29
Identificación de proteínas por espectrometría de masas	30
Resultados	32
Estandarización metodológica	33
Abundancia y diversidad de proteínas	34
Rendimiento de proteínas resolubilizadas	35
Evaluación de la diversidad de proteínas mediante análisis de densidad	36
Comparación de los perfiles 2-DE método 2-D DIGE	39
Perfiles proteínicos de muestras representativas de RMS III y IV(TNM)	41
Discusión	48
Conclusiones	59
Referencias	61

Índice de Figuras

Fig. 1	Distribución de proteínas de saliva	6
Fig. 2	Patrón 2-DE de suero humano	8
Fig. 3	Patrón 2-DE saliva humana	9
Fig. 4	Distribución de los sitios primarios de tumor	14
Fig. 5	Rabdomiosarcoma embrional	15
Fig. 6	Rabdomiosarcoma variante botroide	15
Fig. 7	Rabdomiosarcoma alveolar nasal	16
Fig. 8	Gráfica de efecto-subtipo histológico	17
Fig. 9	Interrelación de los factores pronósticos	18
Fig. 10	Diseño experimental de generación d gel maestro y <i>pool</i> de casos	21
Fig. 11	Electroforesis SDS	34
Fig. 12	Histograma de densidad de los métodos de colección de saliva	34
Fig. 13	Porcentaje de recuperación proteínica	35
Fig. 14a	Electroforesis SDS(tinción de plata)	36
Fig. 14b	Electroforesis SDS(Deep purple)	36
Fig. 15	Electroforesis desnaturalizante, análisis de densidad	37
Fig. 16	Histograma de rendimiento y variabilidad	37
Fig. 17	Geles 2-DE métodos C y E	38
Fig. 18	2-D DIGE	39
Fig. 19	Histograma de colocación RMS vs controles	40
Fig. 20	Generación gel maestro in silico	41
Fig. 21	Ejemplo de validación tridimensional de cada spot	42
Fig. 22	Comparación de geles maestros in silico	43
Fig. 23	Diagrama de Venn expresión diferencial de spots	43
Fig. 24	Geles 2-DE RMS estadio III y IV	46

Índice de Tablas

Tabla 1	TNM Estadificación - pronóstico	23
Tabla 2	TNM Estadificación pretratamiento (IRSG)	24
Tabla 3	Definición de clasificación TNM	25
Tabla 4	Pasos generales del análisis bidimensional	25
Tabla 5	Procedimiento 2-DE	28
Tabla 6	Frecuencias de subgrupos de RMS	32
Tabla 7	Análisis estadístico (ANOVA) métodos de precipitación	35
Tabla 8	Proteínas identificadas del mapa 2-DE en RMS	44
Tabla 9	Spots que varían entre estadios III y IV (TNM)	47
Tabla 10	Tabla comparativa de estudios 2-DE en saliva	53

Abreviaturas

MeSH	Medical Subject Heading
Mr	Masa relativa
pI	Punto isoeléctrico
TEMED	(N,N,N,N'-tetrametilnediamina)
SDS	Dodecyl sulfato de sodio
LOH	Pérdida de heterozigocidad
LOI	Pérdida de impronta
CV	Coefficiente de variación
2-D DIGE	2- Dimensional Fluorescence Difference Gel
2-DE	Electroforesis bidimensional
RMS	Rabdomiosarcoma
IEF	Isoelectroenfoque

Agradezco y dedico este trabajo:

A los niños y padres cuya esperanza y deseo de vida motivaron su participación y permitieron la conclusión de este trabajo.

A quienes al igual que yo saben que el carácter es la cualidad humana gracias a la cual la inteligencia y voluntad predominan sobre las tendencias inferiores del hombre. Sin permitir que se doblegue su dignidad, voluntad y honor.

(David Salomón Dozal Domínguez 2012)

“Una mente que se abre a una nueva idea, jamás volverá a su tamaño original”

Albert Einstein



Esta investigación contó con el aval y apoyo de la asociación “Aquí Nadie Se Rinde A.C”. a través de su programa “Descubriendo lo desconocido” .



RESUMEN ESPAÑOL

En el curso de la investigación médica, diferentes fluidos corporales han sido estudiados con la intención de identificar firmas moleculares que ayuden en el monitoreo o diagnóstico de una condición patológica particular o un régimen terapéutico.

Con este fin, la saliva representa una opción ideal al ser un recurso de gran abundancia y fácil manipulación que ha permitido identificar la adición de componentes tanto propios como de sitios distantes a la cavidad oral.

Mediante herramientas de análisis proteómicos como electroforesis bidimensional (2-DE), “differential image gel electrophoresis” (DIGE) y espectrometría de masas MALDI-ToF se estudió el patrón global de proteínas existentes en saliva de pacientes con rhabdomyosarcoma (RMS) con la intención de generar un mapa de referencia que pusiera en evidencia cambios en los niveles de expresión, que pudieran asociarse a la entidad tumoral.

El RMS representa el sarcoma más común de la infancia constituyendo el 70% de las neoplasias de origen mesenquimal y el 60% de los sarcomas reportados anualmente. Sus sitios de presentación van desde la vesícula biliar hasta el cerebro; con una alta tendencia de presentación en la región cérvico facial y área parameningea. Pese a que existen marcadores inmunohistoquímicos como MyoD y miogenina, estos resultan útiles solo posterior a la realización de escisiones quirúrgicas o la obtención de biopsias; por ello, el objetivo de este estudio fue: Determinar por medio de 2-DE la existencia de cambios en el proteoma salival en pacientes con RMS, que al ser identificados puedan ser útiles como marcadores biológicos no invasivos para la práctica clínica.

Se generaron geles 2-DE de muestras de saliva colectadas de pacientes con RMS y controles sanos ubicados en la 1ª infancia, para crear un *pool* representativo de cada grupo y evaluar los proteomas generados de cada condición. Posteriormente mediante un diseño de validación (promedio $\leq 3:5$), así como DIGE identificamos variaciones en los perfiles de expresión proteínicas, confirmando su identidad mediante MALDI-ToF.

En nuestro análisis con DIGE identificamos 1775 spots totales, de los cuales 1473 (83.0%) no mostraron diferencias de intensidad, 288 (16.2%) disminuyen y 14 (0.8%) con incremento en su expresión. Al realizar la validación de cada spot se generó un gel maestro virtual de análisis que permitió la confirmación de 102 spots de alta reproducibilidad, 67 constituyendo el perfil proteínico de los controles y 35 constituyendo el perfil proteínico de los RMS, teniendo por tanto 3 spots con expresión diferencial en casos, 35 con expresión diferencial en controles y 32 spots que coinciden en ambas condiciones.

Los 3 spots pertenecientes al grupo de casos fueron extraídos y procesados en forma individual para ser sometidas a análisis por espectrometría de masas, revelando la identidad de las proteínas: Desmogleina-3, Trombospondina-1, Proteína rica en prolina-1 y Mucina-7.

Los resultados confirmaron la existencia de una expresión diferencial en el proteoma salival de pacientes con RMS, que a su vez, permitió la estandarización metodológica de un análisis proteómico bidimensional en saliva.

Concluimos que las técnicas de alta resolución como 2-DE seguidas de DIGE o espectrometría de masas permiten hacer un *screening* completo, y logran con ello la evaluación y análisis de variaciones individuales o colectivas dentro del proteoma, permitiendo la visualización de cambios en los perfiles de expresión de proteínas salivales, sugiriendo la asociación de estas proteínas y el re arreglo bidimensional como resultado de las modificaciones o adaptaciones moleculares generadas por el RMS

ABSTRACT

Up until now, in medical research, different body fluids have been studied with the aim to identify molecular signatures that help in the monitoring or diagnostic of a pathological condition or a therapeutic treatment.

To this end, saliva is an ideal source of great wealth and easy handling which has identified the addition of components both, local or distant sites to the oral cavity.

Using proteomic analysis tools as two-dimensional electrophoresis (2D PAGE), gel electrophoresis differential image (DIGE) and mass spectrometry MALDI-ToF we sought to study the overall pattern of proteins in saliva of pediatric patients with rhabdomyosarcoma (RMS), with the intention of generate a reference map to evidence changes in expression levels, which may be associated with the tumor.

The RMS represents the most common sarcoma in childhood and constitutes 70% of the tumors of mesenchyme origin and 60% of the sarcomas reported annually. It appears in different anatomical sites that range from the gallbladder to the brain, with a high tendency of filing with the facial and cervical region parameningeal area. Although there are immunohistochemical markers such as MyoD and myogenin, these are useful only after surgical excisions or biopsies obtained, therefore the objective of this study was: To determine the existence of changes in salivary proteome in patients with RMS by 2-DE, which once identified may be useful as biomarkers for noninvasive diagnosis in clinical practice.

We generated 2D PAGE gels of saliva samples collected from patients with RMS and healthy controls, all of them in their 1st decade of life with the aim to create a representative pool of each group and to analyze the proteomes generated for each condition. Then through a validation design (average \leq 3:5) and DIGE we identified variations in protein expression profiles, confirming their identity by MALDI-ToF.

In our DIGE analysis we identified 1775 total spots, 1473 (83.0%) showed no differences in expression, 288 (16.2%) decreased and 14 (0.8%) with increased expression, respectively. In conducting the validation of each spot we generated a virtual master gel analysis that allowed the confirmation of 102 spots of high reproducibility, 67 that corresponded to the protein profile of controls and 35 to the protein profile of RMS, thus identifying 3 spots with differential expression in patients with RMS, 35 spots with differential expression in controls and 32 spots present in both conditions.

The 3 spots identified in the group of RMS were extracted and processed individually to be subjected to analysis by mass spectrometry, revealing the identity of the proteins: Desmoglein-3, Trombospondin-1, Proline-rich protein-1 and Mucin-7.

The results confirmed the existence of a differential expression in the salivary proteome of patients with RMS, which, in turn, allowed methodological standardization of a two-dimensional proteomic analysis in saliva.

We conclude that high-resolution techniques such as 2D PAGE and DIGE followed by mass spectrometry allow a full screening and thereby the evaluation and analysis of individual and collective changes in the proteome, allowing the visualization of changes in salivary proteins expression profiles, suggesting an association of these proteins and their rearrangement as a result of molecular modifications or adjustments generated by the RMS.

INTRODUCCIÓN

La saliva es un espejo de la salud humana, este fluido corporal contiene una mezcla compleja de proteínas, glicoproteínas, enzimas, hormonas, minerales, iones amortiguadores, etc.. Su composición se ha asociado a cambios de niveles hormonales, séricos, inmunológicos, toxicológicos e infecciosos. Estas variaciones pueden ser utilizadas para el diagnóstico y monitoreo de diversas enfermedades, así como resultar una herramienta muy útil en las investigaciones clínicas y epidemiológicas pudiendo servir como un marcador de respuesta ante terapéuticas definidas. Consecuentemente éste fluido representa un recurso para el monitoreo de la salud tanto oral como sistémica.¹

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica de alta resolución que permite la separación de mezclas de proteínas altamente complejas. El principio de su elevado poder de resolución se basa en una separación secuencial, primero según su punto isoeléctrico y después según su peso molecular. Con esto se obtiene el perfil de expresión proteínico presente en una mezcla lo cual revela datos cualitativos (presencia o ausencia de una proteína).²

Los patrones de expresión de proteínas cambian bajo diferentes condiciones fisiológicas e incluso patológicas, esto ha permitido establecer asociación entre variación de patrones y diferentes condiciones de salud o enfermedad, que pueden ser definidos como biomarcadores biológicos.

Los rhabdomyosarcomas (RMS) representan los sarcomas de tejidos blandos más comunes en niños, constituyendo aproximadamente el 70% de las neoplasias malignas de origen mesenquimal y el 15% de los tumores sólidos tratados a nivel hospitalario. Su incidencia anual es de 4.5 casos por millón, mostrando una predilección por el género masculino siendo más frecuente en pacientes de raza blanca.

A nivel clínico, se presenta con una amplia variedad morfológica que varía desde lesiones aparentemente inocuas hasta lesiones metastásicas ampliamente diseminadas que involucran la médula ósea y que fácilmente pueden confundirse con leucemias. A la fecha, la confirmación diagnóstica a nivel molecular está restringida a la presencia de marcadores identificados en biopsias mediante técnicas de Inmunohistoquímica, por lo que sólo son útiles posteriores al inicio del tratamiento. Por lo anterior sería de gran utilidad identificar marcadores moleculares tempranos.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar por medio de 2-DE si existen cambios en el proteoma salival en pacientes con diagnóstico confirmado de rhabdomioma comparado con el de individuos sanos.

ANTECEDENTES

Biomarcadores y su aplicación en la medicina

Desde su introducción en 1989 en el Medical Subject Heading (MeSH),³ el término biomarcador se define como un parámetro biológico medible y cuantificable (eje. Concentración enzimática específica, concentración hormonal, distribución fenotípica específica de un gen en una población o presencia de una sustancia biológica), así mismo sirve como índice de las variaciones fisiológicas o de salud, tales como riesgo de una enfermedad, exposición ambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedad y proceso metabólico, entre otros.

El valor fundamental de los biomarcadores es su capacidad para diferenciar dos o más estados biológicos basados en sus características de eficacia que son determinadas por su sensibilidad y especificidad; la sensibilidad mide la capacidad para identificar una enfermedad cuando está presente y la especificidad mide la capacidad de descartar la enfermedad cuando no se encuentra presente.

Basados en su utilidad, los biomarcadores pueden dividirse dentro de la siguiente categoría:⁴

- Detección temprana (si son empleados para el tamizaje o “*screening*” de pacientes para encontrar una enfermedad particular en etapas tempranas).
- Diagnóstico (asociados a presencia o ausencia de enfermedad).
- Pronóstico (cuya expresión sea un reflejo de las probabilidades de supervivencia, detecte un fenotipo agresivo y/o determine como se comportará la enfermedad).
- Blanco o “Target” (si identifica las dianas moleculares de nuevas terapias o si indica modificación en la expresión del marcador afectado por la terapia).
- Predictivo de respuesta terapéutica, por ejemplo ONCOTYPE DX⁵ (Genomic Health, Redwood City, California), que ayudan en la selección de tratamiento de manera individualizada y

MammaPrint ⁶ (Agendia BV, Amsterdam, the Netherlands) que permite la clasificación de subgrupos de pacientes para definir la respuesta terapéutica.

Por su abundancia, las proteínas como biomoléculas del organismo resultan ser la mejor y más empleada fuente de biomarcadores al denotar asociación con un fenotipo particular. Por esta cualidad, las proteínas empleadas como biomarcadores pueden ser clasificadas como: ⁷

- Proteínas de expresión diferencial (su nivel de expresión puede estar aumentado o disminuido en los pacientes comparada con controles normales u otro grupo de enfermedades; pueden a su vez detectarse en diferentes etapas donde su correlación podría definir su utilidad predictiva). A la fecha, las proteínas de expresión diferencial son el principal foco de atención para los proyectos de identificación de biomarcadores. Ejemplos de este tipo de biomarcadores es Her2 en cáncer de glándula mamaria o el patrón de bandedo de Ig en mieloma múltiple.
- Proteínas modificadas postraduccionalmente de manera diferencial.
Son aquellas modificadas en asociación a un fenotipo que puede servir de biomarcador, por ejemplo la utilidad diagnóstica de la fosforilación de serina 73 de citoqueratina 8 en adenocarcinoma de cabeza y cuello.
- Biomarcadores primarios y secundarios: ⁸ i) primarios son proteínas cuyos niveles de expresión, estatus de modificación, variante de splicing y otras isoformas son responsables del fenotipo investigado; ii) secundarios son aquellos que provienen como consecuencia de una enfermedad pero no se cree que son los responsables primarios para la patogénesis de la enfermedad.

Pese a esto, la utilidad de un biomarcador no está necesariamente determinada por si es primario o secundario ya que como se mencionó anteriormente otras métricas como especificidad y sensibilidad definen su uso, como ejemplos más claros tenemos al antígeno prostático específico (PSA), ⁹ en la actualidad el mejor biomarcador general de suero para el cáncer de próstata, tiene una alta sensibilidad (superior al 90%) pero baja especificidad (~ 25%) que se traduce en biopsias a hombres sin cáncer de próstata. El biomarcador tumoral sérico de cáncer de mama CA15.3 ¹⁰ tiene sólo el 23% de sensibilidad y especificidad del 69% y sólo es útil en el seguimiento de la terapia para el cáncer de mama avanzado o recurrencia.

De manera utópica, se esperaría encontrar y emplear biomarcadores 100% específicos y sensibles, pero en la práctica como ya se ha mencionado no superan el 65% de sensibilidad con un ~25% de especificidad como resultado provisorio. Sin embargo, la investigación de biomarcadores pueden conllevar a que su identificación resulte en la redefinición de las enfermedades y sus tratamientos mediante la modificación de las prácticas tradicionales dependientes de los síntomas y la morfología a una más racional y objetiva con bases moleculares ⁵.

Saliva

Por muchos años la investigación de la saliva se ha enfocado en el análisis de las bases bioquímicas y los aspectos fisiológicos de individuos sanos, pero su valor intrínseco como potencial indicador de salud sistémica aún no ha sido plenamente explotado.

El uso de saliva en el establecimiento de diagnóstico e investigación tiene obvias ventajas contra las muestras de sangre; ^{11,12} su obtención no requiere de técnicas invasivas que conlleven a episodios desagradables o de estrés por parte del paciente, reduce costos tanto para la obtención como para la manipulación, facilita la obtención de múltiples muestras y no requiere de grandes volúmenes para ser evaluada. Todo esto es particularmente útil en áreas como la pediatría.

El rango de concentración de proteínas totales en saliva oscila entre 1-2 mg/ml; ¹³ la cantidad de saliva total puede reflejar la adición de componentes de otros sitios a la cavidad oral, y estos componentes pueden denotar una variedad de enfermedades sistémicas. ¹⁴

Dado que en este fluido existen microorganismos y componentes celulares presentes por descamación del epitelio de la cavidad oral o de los conductos glandulares, la saliva ha sido usada como recurso en genómica y técnicas de ciencias forenses por su naturaleza de colección, el contacto directo con la cavidad oral y la relación entre el fluido oral y los niveles de sangre.

Fisiología salival

La saliva es producida y secretada principalmente por un grupo glandular denominado “glándulas mayores” (submandibular, sublingual y parotídea) y un segundo grupo “glándulas menores” (labiales, bucales, linguales “glándulas de Von Ebner”, palatinas) que en conjunto producen un volumen de 1000-2000 ml/día, su secreción es controlada principalmente por el sistema nervioso autónomo y dependiente a su vez de estimulación simpática y parasimpática. ¹⁵

La secreción de cada una de estas glándulas tiene una composición proteínica característica, la principal proteína constituyente de la saliva parotídea es la amilasa(20%), fosfoproteínas como la estaterina (7%) y proteínas ricas en prolina (60%) siendo con esto una de las funciones más importantes la neutralización de ácidos y formación de biofilm dental, así como funciones digestivas como el rompimiento del almidón por la enzima amilasa convirtiéndola en maltosa soluble y fragmentos de dextrina iniciándose con ello la digestión o por medio de la enzima lipasa para la digestión de grasas. ¹⁴

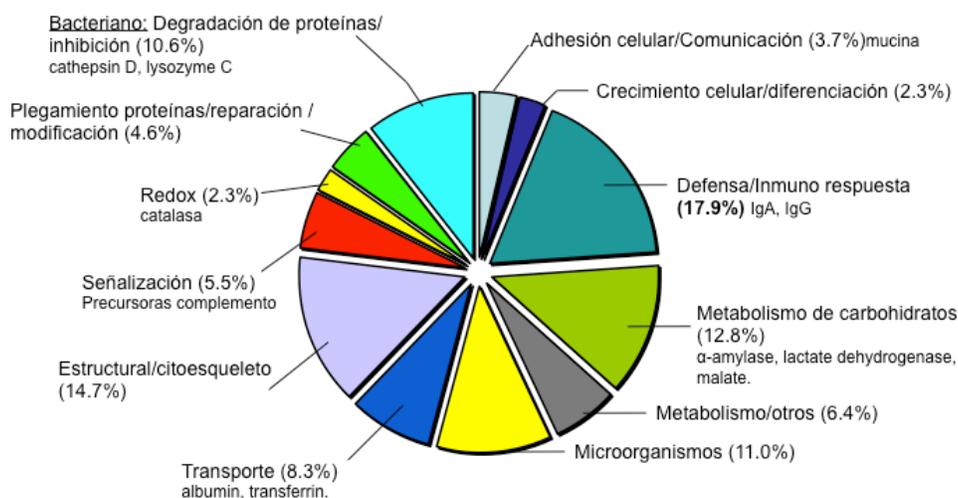
Las glándulas submandibular y sublingual junto con las glándulas menores son las principales generadoras de mucinas (MUC5B y MUC7). MUC5B cubre y protege las superficies orales actuando como una barrera que impide la entrada de agentes nocivos, atrapa un número limitado de bacterias orales particularmente *Helicobacter pylori* y *Haemophilus parainfluenza*, hongos como *Candida albicans*, y también puede atrapar virus como el HIV-1. ¹⁶

MUC7 juega un importante papel en contra de bacterias y virus incluido HIV, el cual es encapsulado e inactivado por esta enzima, otra de sus funciones es favorecer la adhesión de bacterias como *Streptococcus mutans* a superficies dentales para la formación de el biofilm dental. ¹⁴

El volumen producido y la composición proteínica de la saliva sufre desequilibrios normales diarios y durante toda la vida en los sistemas colinérgicos y adrenérgicos asociados a diversos factores extrínsecos como la dieta diaria, estimuladores gustativos como los ácidos que modifican la fluidez y concentración de bicarbonato en saliva ¹⁷, medicación y radiación así como intrínsecos siendo uno de los más representativos la xerostomía en pacientes con síndrome de Sjögren o en pacientes que son sometidos a radioterapias convencionales de un tumor en la cavidad oral u orofaringe, los cuales resultan a menudo en una completa e irreversible destrucción de las glándulas salivales mayores.^{14,18}

Fisiopatología salival

Se han reportado numerosos estudios en donde estas variaciones proteínicas han conducido al desarrollo de biomarcadores salivales que ayudan al establecimiento de diagnóstico, monitoreo de progresión de la enfermedad, recurrencia predictiva y eficacia terapéutica.¹⁹ Shen Hu, y Jianghua Wang en el 2007 publican sus resultados al respecto de biomarcadores salivales para la detección de Síndrome de Sjögren primario.²⁰



1381 proteínas totales 38.5% sangre

Figura 1. Distribución de las proteínas de saliva; el 38.5% de las identificadas por el grupo SWISS- PROT corresponden con la identificadas en sangre.

En el 2008, Denhy P y Hagen F. encontraron cientos de proteínas en saliva presentes también en plasma, sugiriendo con esto que muchas proteínas plasmáticas se encuentran en la saliva.²¹ (Fig. 1) En el mismo año Shen Hu, Martha Arellano y cols.²² propusieron el uso de biomarcadores salivales para el diagnóstico de cáncer oral, como el carcinoma oral de células escamosas proponiendo en un futuro esta herramienta de diagnóstico no invasiva.

De manera paralela un consorcio de tres grupos de investigación dirigidos por el Dr. Wong llevó a cabo el Proyecto Proteoma Salival Humano con el cual se busca identificar proteínas con potencial

diagnóstico y/o pronóstico para ser empleadas como biomarcadores en un contexto clínico de detección de enfermedad y monitoreo de saliva.²³

Proteómica

El término proteoma lo utilizó por primera vez Marc Wilkins en 1995 para describir el complemento proteínico de un genoma²⁴. Poco después se empleó el término proteómica para señalar el estudio del proteoma, que es el conjunto de todas las proteínas presentes en una célula, microorganismo o un medio biológico en un momento determinado. Esto incluye no solo proteínas traducidas directamente a partir del material genético, sino también todas las proteínas modificadas por splicing alternativo de los transcritos primarios, el procesamiento posterior a la traducción o la combinación de ambos. El proteoma no es un componente estático, como el genoma sino dinámico ya que refleja tanto el programa genético intrínseco de las células como el impacto de su entorno.

El análisis proteómico implica la separación de proteínas a partir de mezclas complejas de una línea celular, tejido o fluido por procedimientos como electroforesis y/o cromatografía. Basándose en que cada proteína se puede distinguir de otra por constantes fisicoquímicas como: su peso molecular, punto isoelectrico (2-DE), coeficiente de partición, densidad de carga o peso molecular (Cromatografía).

El análisis por espectrometría de masas de las fracciones separadas por electroforesis o cromatografía permite identificar las proteínas e incluso sus posibles modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, fosforilaciones, etc....

La proteómica es, por tanto, una ciencia multidisciplinaria que estudia el perfil de expresión de las proteínas pertenecientes a un individuo en términos de espacialidad y temporalidad;^{25,26} Es decir, en cualquier punto dado en el tiempo, ¿qué proteínas se expresan y dónde están?

Proteómica de fluidos

El análisis de las proteínas en fluidos biológicos se ha utilizado desde hace tiempo para el diagnóstico y seguimiento de un gran número de enfermedades. Primero fue la cuantificación de proteínas totales, posteriormente la separación electroforética y recientemente la proteómica ha permitido el análisis simultáneo de cientos de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) ²⁷, así como el análisis de sus modificaciones estructurales para su posterior identificación mediante espectrometría de masas.

Considerando que se trata de una mezcla heterogénea de proteínas, la proteómica resulta una herramienta adecuada para el estudio de fluidos, ya que nos permite estudiar variaciones en su compleja composición proteínica en un momento en particular. En la actualidad se reconocen más de 1,100 distintas proteínas en la saliva humana, cuyas variaciones en peso molecular y punto isoeléctrico pueden visualizarse con relativa facilidad en geles de dos dimensiones (2-DE). Este tipo de análisis aplicado a líquidos corporales como suero (Fig.2) y saliva (Fig.3) ha demostrado que estos proteomas son dinámicos y que algunas proteínas cambian según el ambiente y estado fisiológico de salud o enfermedad en que se encuentre el organismo.

Este tipo de cambios se emplean como marcadores biológicos de gran utilidad en el pronóstico, diagnóstico, estadificación de episodios clínicos y seguimiento de las entidades patológicas a las que se asocian

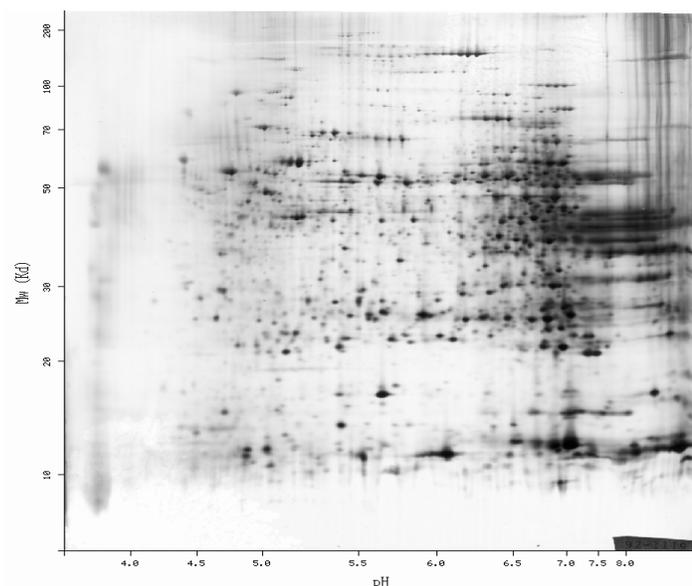


Figura 2. Patrón proteínico de suero humano generado por electroforesis bidimensional (2-DE).

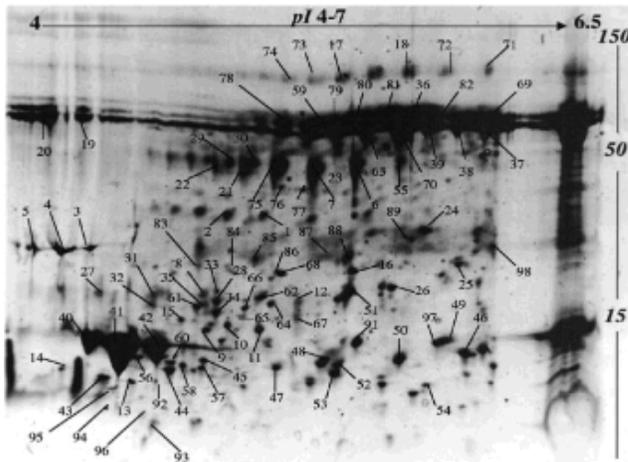


Figura 3. Patrón proteínico de saliva humana generado por electroforesis bidimensional (2-DE).

Los 2-DE, seguidos de espectrometría de masas de proteínas específicas y cromatografía bidimensional se han convertido en las herramientas centrales en proteómica ²⁸ al estudiar el patrón global de las proteínas, su expresión, identificación y caracterización.

Electroforesis

La electroforesis es un método analítico en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su relación tamaño-carga eléctrica, usándose como base de desplazamiento una matriz gelatinosa. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son posicionadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta. Después de transcurrido cierto tiempo, las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (polo positivo).

La base de desplazamiento sobre la que tiene lugar la separación de las especies es un gel de poliacrilamida, este tipo de análisis se caracteriza porque:

- La migración es proporcional a la carga neta, el tamaño y la forma de la proteína.
- Los geles son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica.
- Los geles de poliacrilamida (PAGE) se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador (TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) catalizado por el ión persulfato ($S_2O_8^-$), que se añade en forma de persulfato amónico.

En función del estado de las proteínas a lo largo del proceso electroforético, éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturizantes:

- En una **electroforesis desnaturizante**, las proteínas previo a su migración se someten a una desnaturización completa (pérdida de la estructura tridimensional). En esta condición, la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula sin que su forma tenga un efecto significativo.
- En una **electroforesis nativa**, las proteínas migran sin ser sometidas a una desnaturización previa. En esta condición su desplazamiento se da en función de su carga, tamaño y forma, por ello esta modalidad es particularmente útil para identificar complejos o interacciones entre subunidades.

La electroforesis desnaturizante se emplea de manera rutinaria en 2-DE y se lleva a cabo mediante el uso de detergentes como el dodecyl sulfato de sodio (SDS). Las muestras previamente se desnaturizan por calor en presencia del agente reductor beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro así como con el detergente SDS que desnaturiza y recubre a la proteína, lo cual permite que se separen como cadenas polipeptídicas aisladas.

El SDS es un detergente que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas. Ésta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS migren hacia el ánodo.²⁹

Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2-DE)³⁰ permite estudiar de forma cualitativa el patrón global de proteínas, que pone en evidencia cambios tanto en los niveles de expresión como de modificaciones postraduccionales que puedan afectar el peso molecular o el punto isoeléctrico, como es el caso de las glicosilaciones sulfatadas de la familia de PRPs (Proteínas ricas en prolina)³¹ presentes en saliva.

Por tanto, se trata de una técnica de alta resolución que permite la separación de mezclas de proteínas de gran complejidad. La base del elevado poder de resolución de la 2-DE radica en una

separación secuencial, primero con base en su punto isoeléctrico (primera dimensión) seguido de una separación basada en su peso molecular (segunda dimensión).

Una vez separadas las proteínas, estas pueden visualizarse usando diferentes métodos de detección en gel. Durante las últimas décadas las demandas de mejora de la sensibilidad para muestras con poca masa, el desarrollo de nuevos instrumentos de detección y la compatibilidad con las aplicaciones posteriores como la espectrometría de masas han impulsado el desarrollo de varios métodos de tinción.

Las tinciones se fundamentan en la fijación del colorante o agente a las proteínas, el método de detección más común es la tinción con Coomassie el cual se une a residuos básicos e hidrofóbicos como lisina o triptofano. Debido a que las proteínas tienen diferentes composiciones de aminoácidos, la intensidad de la tinción es dependiente de las diferencias inherentes a su composición de aminoácidos. Esto explica por qué su poder de detección oscila dentro de un rango ubicado entre 10-25 ng para la mayoría de las proteínas. Una ventaja de este tipo de colorantes es que debido a que no ocurren modificaciones químicas durante la tinción, es posible recuperar las proteínas para su análisis bioquímico, su secuenciación o su caracterización por espectrometría de masas.

La tinción de plata es el método colorimétrico más sensible para la detección de proteínas totales. La técnica implica la deposición de plata metálica en la superficie del gel en el lugar de bandas o "spots" de proteínas. Los iones de plata interactúan y se unen con los grupos funcionales de proteínas; las interacciones más fuertes ocurren con ácidos como ácido aspártico y glutámico, imidazoles como histidinas, sulfidrilos como cisteínas y aminas como el caso de lisina. Estas interacciones son las responsables de el rango de detección menor a 0.5 ng de proteína.

Esta técnica de tinción requiere de agentes sensibilizadores y potenciadores para controlar su especificidad y eficiencia. Desafortunadamente debido a que emplea glutaraldehído o formaldehído no es compatible con la espectrometría de masas debido a que genera un entrecruzamiento de las proteínas con la matriz del gel y entre las proteínas.

Algunos limitantes técnicos de los colorantes anteriores han sido reducidos mediante colorantes fluorescentes ultrasensibles como el "Deep Purple" cuya clave es un compuesto fluorescente extraído de

un hongo llamado epicoconone, esta molécula de bajo peso molecular se une covalentemente a aminas primarias como residuos de lisina. Así como también se asocia al recubrimiento de SDS alrededor de las proteínas en geles, lo que aumenta su rendimiento cuántico en orden de magnitud.³² Este doble mecanismo requiere menos destinción para generar baja fluorescencia de fondo.

Las proteínas acopladas a este compuesto se pueden visualizar empleando un escáner de alta sensibilidad con láser a (457 o 532 nm) "Typhoon GE Healthcare". Las moléculas excitadas permiten la visualización de proteínas con un poder de detección menor a 0.5 ng. Una ventaja adicional de este compuesto es que su adición resulta reversible y 100% compatible con espectrometría de masas.

Tras la tinción del gel con compuestos fluorescentes las proteínas resueltas se observan como patrones de manchas, también conocidas como "spots". Estos patrones pueden digitalizarse y ser procesados por programas que permiten analizar y comparar cientos o incluso miles de manchas. Mediante este sistema se genera un perfil de las proteínas presentes en una mezcla y revela datos cualitativos (presencia o ausencia de una molécula).³⁰

Los 2-DE siguen siendo la mejor herramienta utilizada en la confección de mapas de referencia, es decir, en la disección de la composición proteínica de un determinado organelo, tipo celular o fluido corporal. Cuando estos mapas se utilizan para comparar distintas situaciones experimentales (distintos tratamientos con fármacos o compuestos tóxicos, tejido sano o enfermo) la electroforesis adquiere toda su importancia.

De este modo, mapas proteínicos 2-DE de varias muestras extracelulares biomédicas como plasma,³³ fluido cerebroespinal, orina,³⁴ fluido nasal³⁵ y fluido bronco alveolar³⁶ han proporcionado herramientas valiosas para la identificación de marcadores para diversas enfermedades.

Técnicas bioquímicas clásicas de separación³⁷ se han aplicado durante tres décadas para aislar y caracterizar proteínas secretadas por las glándulas salivales mayores. Las proteínas contenidas en secreciones de glándula parótida pueden separarse por intercambio aniónico y cromatografía en varias fracciones, cada una de estas fracciones han sido utilizadas para purificación final de componentes

individuales. Tales trabajos han permitido el descubrimiento y caracterización de proteínas salivales como amilasas, proteínas ricas en prolina,³⁷ estaterinas,³⁸ histatinas,³⁹ peroxidada,⁴⁰ cistatinas⁴¹ y mucinas.⁴²

Una única característica de muchas de estas proteínas mayores es que permiten visualizar polimorfismos genéticos y constituyen numerosas familias de estructura y funcionalidad cercana relacionada a sus moléculas.

Rabdomiosarcoma

(Miosarcoma, rabdiomioma maligno, rabdosarcoma, sarcoma embrional, rabdomioblastoma (WHO))⁴³

Los rabdomiosarcomas han sido estudiados desde 1854, cuando por primera vez se reportó un caso en lengua en un paciente masculino de 21 años. Esta neoplasia se presenta en una gran variedad de órganos que incluyen desde la vesícula biliar hasta el cerebro; tiende a presentarse en la región cérvico facial (piel cabelluda, boca, orofaringe, laringe, parótida y cuello), principalmente en los tejidos blandos periorbitarios (representando el 29% los que se localizan en la región cérvico facial y 13% de todos los RMS en niños), área parameníngea (nasofaringe, senos paranasales, oído medio, mastoides, fosa pterigopalatina, fosa infratemporal). Los signos y síntomas depende de su localización, apariencia clínica y el subtipo histológico cuya variedad es amplia, lo que puede dificultar su diagnóstico.^{44, 45, 46}

El rabdomiosarcoma es una neoplasia maligna con fenotipo de músculo estriado. Aproximadamente el 40% ocurre en la región de cabeza y cuello⁴⁷ (Fig. 4) Representa el sarcoma más común de la infancia con una media de edad de aparición de 5 años; el subtipo predominante de este grupo es el embrionario.

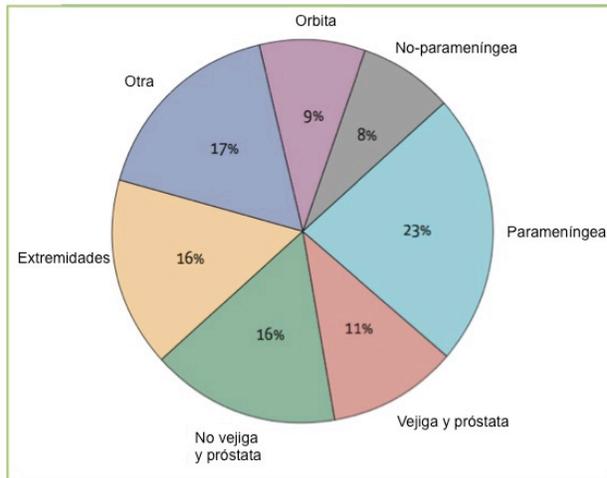


Figura 4. Distribución de los sitios primarios de tumor; los sitios parameningeos son los que están localizados anatómicamente en proximidad con la base del cráneo y adyacentes a las meninges eje. nasofaringe, oído medio. Los sitios “no de vejiga o próstata” incluyen paratesticular, vagina y útero. ⁴⁷

En la región de cabeza y cuello la localización mas frecuente es la nasofaringe. Clínicamente, los pacientes al inicio consultan por la presencia de una masa que causa agrandamiento y/o asimetría facial, dificultad respiratoria, epistaxis y síntomas semejantes a sinusitis pero de corta duración.

Este tumor a menudo disemina a sitios contiguos incluidos la base del cráneo, huesos temporales y órbita; alrededor del 40% metastatiza a nodos linfáticos, huesos y pulmones, siendo menos común a médula ósea, tejido blando, hígado y cerebro. Este tumor está estatificado de acuerdo al Intergrupo de estudio de rhabdiosarcoma;⁴⁸ Grupo I: incluye enfermedad local, Grupo II: enfermedad residual o diseminación local, Grupo III: resección incompleta o biopsia con márgenes residuales de la enfermedad, Grupo IV: enfermedad metastásicas o comienzo de esta.

Este tumor es deficientemente circunscrito y las imágenes de TAC (tomografía axial computada) o RMN (resonancia magnética nuclear) son necesarias para determinar el tamaño y relación anatómica del tumor. El tipo de técnica que se seleccione para el diagnóstico por imagen depende en parte de su localización, ya sea intraóseo o en tejidos blandos.

La clasificación más amplia y completa es la propuesta por Horn y Enterline, ⁴⁹ quienes lo categorizan como embrional, botroide, alveolar, pleomórfico y anaplásico. La forma embrional, (Fig. 5) común en cabeza, cuello y región genitourinaria, está caracterizada en un 70-100% de los casos, a una anomalía citogenética causada por una pérdida de heterozigocidad (LOH) ó pérdida de la impronta (LOI) de un locus específico en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5); Cerca de este locus, hay

genes reguladores de crecimiento, proliferación y apoptosis, así como también genes supresores tumorales.

LOH ó LOI de 11p15 están asociadas con una sobreexpresión del factor de crecimiento 2 de insulina (IGF2), conocido por su participación en la tumorigénesis de diversas enfermedades neoplásicas.⁵⁰

Se caracteriza por la presencia de áreas celulares densas y focos mixoides, siendo característica la presencia del rabiomioblasto, que es una célula de morfología redonda y oval con núcleo excéntrico y abundante citoplasma eosinófilo.

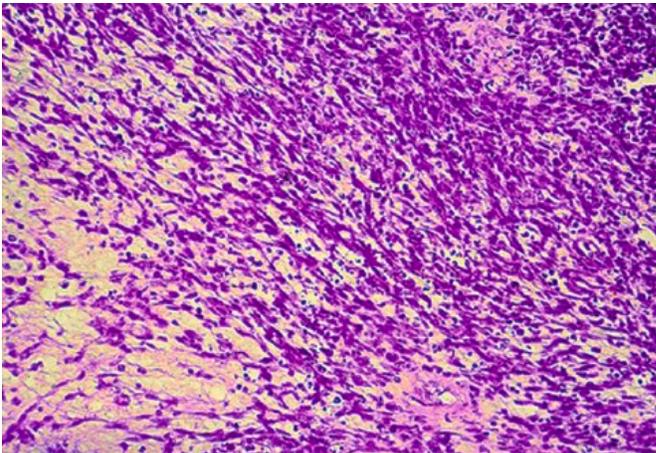


Figura 5. Rabdomiosarcoma embrional. Densa condensación de rabiomioblastos con pérdida del estroma mixoide.⁴⁹ (H&E 10X).

La variante botroide, (Fig. 6) frecuente en vagina, vejiga, faringe y sistema biliar, presenta una densa banda subepitelial de células tumorales que contrastan con la porción profunda tumoral, relativamente hipocelular y similar a la zona de recambio de un árbol en crecimiento.

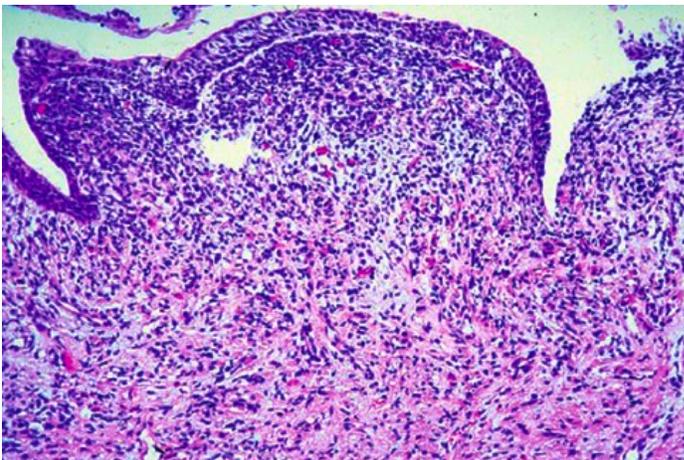


Figura 6. Rabdomiosarcoma variante botroide. (Células pequeñas en superficie epitelial con condensación de células tumorales en la zona inmediata subepitelial).⁴⁹ (H&E 10X)

El tipo alveolar, común en tórax y extremidades se caracteriza en un 70% y 20% de los casos respectivamente a dos distintas translocaciones PAX3-FKHR t(2;13)(q35;q14) ó PAX7-FKHR t(1;13)(q36;q14). Estas translocaciones son consideradas útiles para el diagnóstico mediante pruebas de citogenética rutinaria o por RT-PCR y FISH para identificar las proteínas de fusión PAX3-FKHR ó PAX7-FKHR.⁵⁰

Durante el desarrollo, PAX3 se expresa en los miotomos de músculo esquelético de las extremidades. PAX7 se expresa durante la embriogénesis después de PAX3 en el desarrollo de miotomos, pero no en sitios distales. El gen FKHR codifica para factores de transcripción relevantes durante la embriogénesis. PAX7-FKHR tiende a verse en niños con RMS alveolar localizado en extremidades. Esta translocación está asociada con una mayor sobrevida comparada con PAX3-FKHR.⁵⁰

La detección de PAX3-FKHR o PAX7-FKHR en el tejido del sitio primario, médula ósea o sangre periférica puede indicar enfermedad mínima residual.

Histológicamente es muy similar a los alvéolos pulmonares fetales, caracterizado por la formación de septos fibrosos de donde penden mioblastos individuales, además presenta células tumorales, grandes, multinucleadas que contienen abundante citoplasma eosinófilo.⁴⁵ (Fig.7) Su patrón histológico se asocia con un pronóstico menos favorable y se caracteriza por una disminución de la sobrevida respecto al tipo embrional, (Fig. 8). Los pacientes con este subtipo tienden a ser mayores, con presentación tumoral en extremidades y con más propensión a desarrollar metástasis.

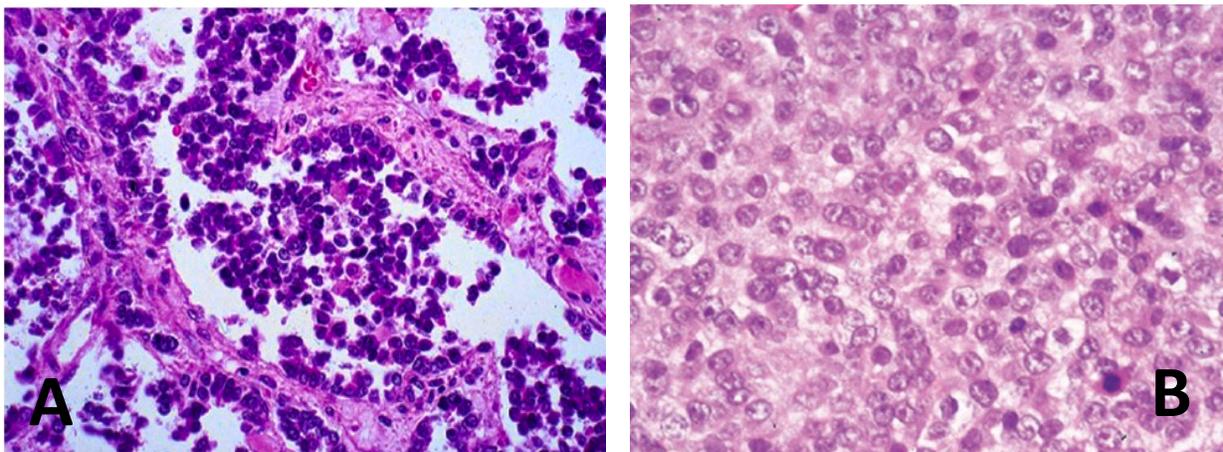


Figura 7. A Rabdomiosarcoma alveolar nasal, con patrón alveolar típico. **B** Las células tumorales son ovoideas con presencia de núcleos hiper cromáticos y escaso citoplasma eosinófilo.⁴⁹ (H&E 40X)

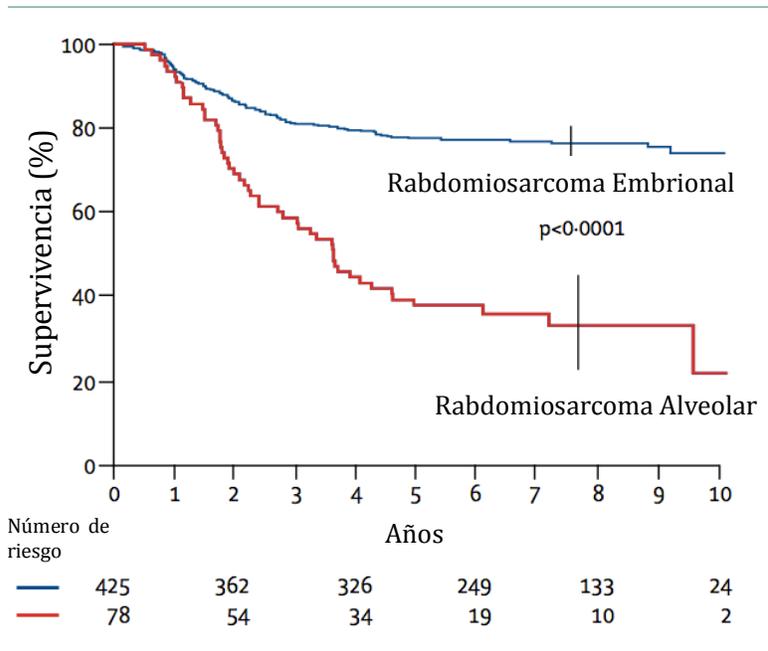


Figura 8. Gráfica comparativa de supervivencia asociada al subtipo histológico; las barras verticales marcan los 5 años de supervivencia global.⁴⁷

Debido al alto grado de dificultad diagnóstica que estos tumores pueden presentar, los estudios como inmunohistoquímica son necesarios para confirmar su diagnóstico. Los RMS exhiben inmunoreactividad para mioglobina, actina de músculo específica, desmina, miogenina nuclear y miosina rápida. Menos del 20% de los casos son positivos para CD99.

El diagnóstico diferencial de RMS embrional incluye pólipos sinonasales con estroma atípico y varios sarcomas. El diagnóstico diferencial del tipo alveolar incluye varios tumores de células redondas azules, incluyendo linfoma, carcinoma sinusal indiferenciado, carcinoma de células pequeñas de tipo neuroendocrino, sarcoma de Ewing y neuroblastoma olfatorio.

Se ha reportado cierta susceptibilidad genética atribuida a mutaciones en la línea germinal de TP53 en el síndrome Li-Fraumeni.

El pronóstico está determinado por la edad del paciente, estadio clínico, sitio del tumor primario y subtipo histológico. (Fig. 9) En general, la población pediátrica tiene mejor pronóstico que los casos de adultos siendo la forma embrionaria de mejor pronóstico que el tipo alveolar. El tipo pleomórfico es infrecuente en región de cabeza y cuello.

Debido a que el RMS es un tumor quimiosensible, la quimioterapia es el tratamiento primario de elección. Para aquellos casos en que no se obtiene remisión completa o para tumores recurrentes luego de la quimioterapia, existe actualmente un protocolo multimodal que incluye cirugía ablativa con preservación de estructuras importantes, braquiterapia y cirugía reconstructiva conocido con el nombre de protocolo AMORE.^{51,52} Sin embargo, el uso óptimo del protocolo, el tiempo y la intensidad de estas modalidades de tratamiento deben ser planificados con respecto a los factores pronósticos conocidos, incluyendo el sitio de tumor primario, grado de enfermedad, subtipo patológico y las secuelas del tratamiento.

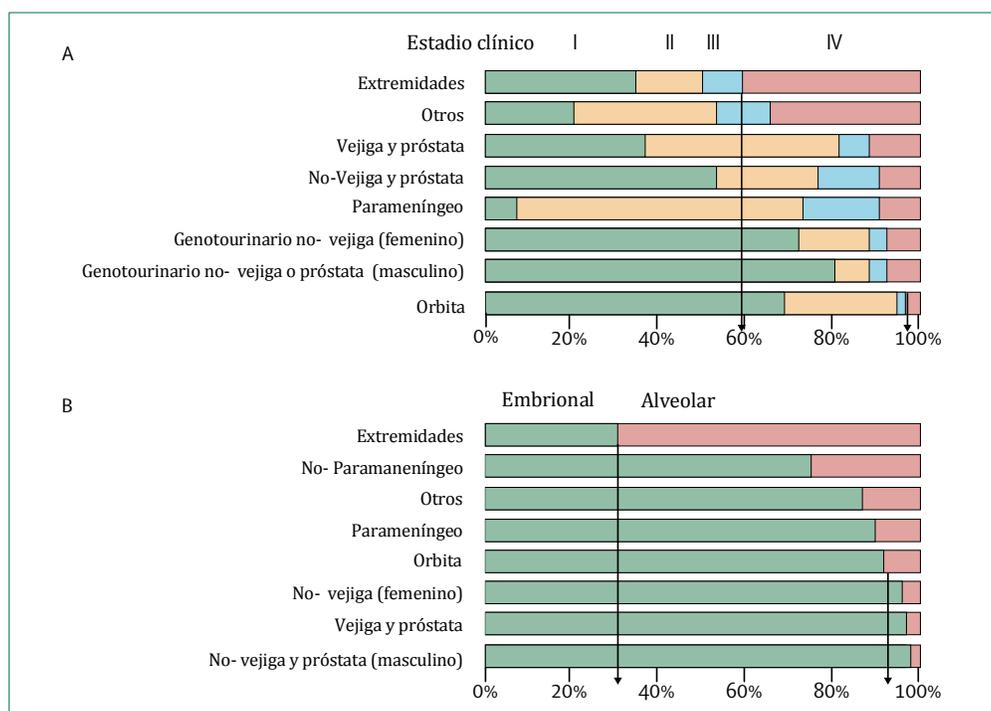


Figura 9: Interrelación de los factores pronósticos. (A) Relación entre (*SIOP TNM) estadio clínico y sitio. Estadio I es un tumor localizado (T1) confinado al tejido u órgano de origen. Estadio II es un tumor local extenso (T2). Estadio III involucra ganglios linfáticos regionales. Estadio IV metástasis a distancia. Las tasas de enfermedad metastásica varían de 4% para los de localización orbital a aproximadamente 40% en extremidades. (B) Relación entre el sitio y el subtipo histológico. La frecuencia de alveolar (desfavorable) varía de 8% para los tumores de la órbita a 69% para los tumores de las extremidades. *SIOP(Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica).⁴⁷

Como ya se mencionó anteriormente diversos factores pueden estar alterando la composición proteínica salival de un individuo ya sea sano o enfermo; Se ha demostrado que los pacientes que se han

sometido a tratamientos de radioterapia o quimioterapia presentan una disminución de su nivel de producción salival debido a una atrofia de las glándulas salivales, incluso cuando la exposición a radioterapia no se realiza simétricamente.¹⁴

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La detección de diversas biomoléculas en fluidos corporales ofrece la posibilidad de valorar la respuesta a un fármaco y determinar la presencia o ausencia de una enfermedad.

En áreas médicas como pediatría, las obtenciones clásicas de muestras pueden llegar a generar episodios dolorosos y cargas de estrés, que en algunas ocasiones dificultan la labor del operador, obtienen volúmenes insuficientes o representativos, todo esto conllevando a la deserción al tratamiento por parte del paciente.

Por todo esto, la identificación de marcadores biológicos a través de procedimientos no invasivos como la saliva puede ser una herramienta muy útil para la práctica clínica e investigación de los procesos de salud – enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Los proteomas de biofluidos son especialmente valiosos por su potencial importancia clínica como fuentes de biomarcadores de enfermedad, en este contexto, la saliva contiene un arreglo de péptidos y proteínas que juegan una amplia variedad de roles.

Un análisis global del proteoma salival humano puede en principio proveer un profundo entendimiento de la biología oral y enfermedades. Debido a su accesibilidad, la saliva es también un medio atractivo para el diagnóstico no invasivo y/o pronóstico de enfermedad humana. El análisis proteómico de la saliva sobre el curso de progresión de la enfermedad puede revelar biomarcadores valiosos para la temprana detección y monitoreo del progreso de la enfermedad.⁵³ Proporcionando información adicional esencial en muchos casos

El propósito de este trabajo es analizar los patrones proteínicos salivales de pacientes con rhabdomioma que al ser comparados con los patrones derivados de individuos sanos, nos permita identificar las variaciones en los patrones de expresión, y de manera complementaria estudiar su posible asociación y/o correlación con esta entidad nosológica, cuyo uso pueda definir y complementar el estudio de biomarcadores de saliva con fines de diagnóstico temprano, pronóstico ó respuesta a tratamiento en cáncer infantil.

HIPÓTESIS

Si el patrón de proteínas salivales en pacientes con diagnóstico confirmado de rhabdomioma presenta modificaciones al compararlo con el patrón presente en sujetos no afectados; entonces estas variaciones identificarán condiciones asociadas a la enfermedad y por tanto tendrán utilidad como biomarcadores de diagnóstico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar por medio de 2-DE la existencia o no de cambios en el proteoma salival en pacientes con rhabdomioma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Montar una herramienta que pueda distinguir de manera reproducible variaciones en los patrones proteínicos salivales que puedan complementar la investigación clínica de fluidos corporales.

TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, Observacional, Comparativo, de muestras pareadas

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre muestras de saliva colectadas de pacientes ubicados en la primera infancia con un diagnóstico confirmado de Rabdomiosarcoma subtipos embrional y alveolar pertenecientes al servicio de Oncología pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría (INP), una vez obtenida esta se realizaron geles bidimensionales para conocer el mapa proteómico existente en la saliva. Así mismo, de cada niño se obtuvo un triplicado y se generaron un *pool* de casos así como su gel maestro in silico (Fig. 10). Este fue comparado con el mapa proteico de saliva de individuos que no presentaron dicha enfermedad.

La muestras de saliva se colectaron de pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y sus respectivos controles pareados por edad y género siguiendo los protocolos generales de obtención del NIH para muestras de saliva analizadas por 2-DE y espectrometría de masas.

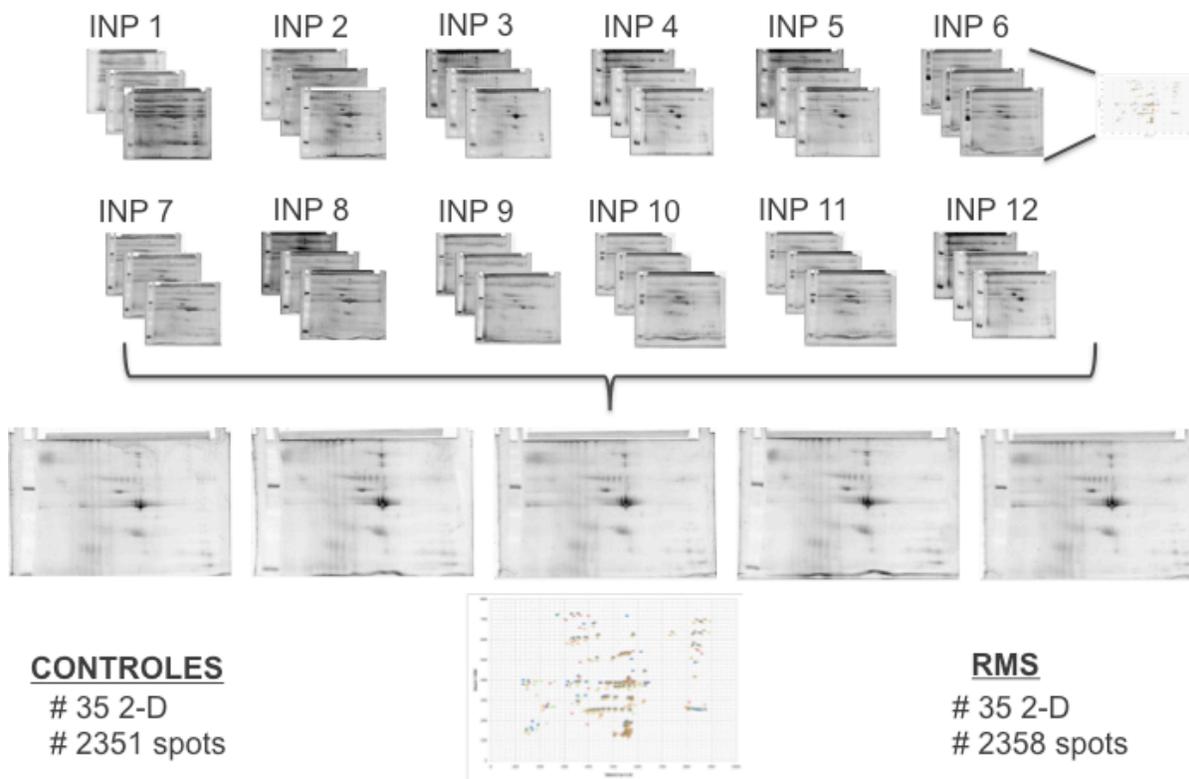


Figura 10. Diseño experimental de generación del gel maestro y *pool* de casos.

Se emplearon como controles niños pareados por edad y género correspondientes a las características de cada niño con RMS incluido en el estudio, determinándose para cada uno :

- volumen de saliva obtenida
- concentración proteica
- patrón bidimensional de proteínas

CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado de Rabdomiosarcoma subtipo histológico alveolar o embrional con localización en cabeza y cuello, ubicados en grupos de edades de 4-11 años en hombres y 4-10 años en mujeres con carta de consentimiento y asentimiento informado.

Que no presenten lesiones orales propias del tratamiento como mucositis ni infecciones de vías aéreas altas al momento de la toma de muestra.

Si bien se ha encontrado asociación de rabdomiosarcoma infantil de cabeza y cuello a malformaciones genitourinarias así como antecedentes personales o familiares de Neurofibromatosis y/o Síndrome Li-Fraumeni, su falta de asociación no afectará la inclusión de estos.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes cuya lesión tumoral no corresponda a la del estudio o su patrón histopatológico corresponda al pleomórfico.

Pacientes femeninas que pese a corresponder en el grupo de edad estudiado, ya haya iniciado su menarca, esto debido a la carga hormonal que acompaña a la etapa puberal, la cual pudiera generar patrones no comparables con el género masculino o modificaciones en los proteomas salivales derivados del desarrollo biológico.

Presencia de sangrados en la cavidad bucal o que no sigan los procedimientos previos a la toma de la muestra.

CRITERIOS DE ELIMINACION

Pacientes en quienes no se pueda realizar la maniobra de toma de muestra, o cuyos padres o ellos decidan no continuar con el estudio.

Debido a que en la literatura no hay reportes previos de marcadores biológicos asociados a saliva en población infantil con RMS, el cálculo muestral no es posible para que los resultados del estudio tengan significancia estadística, por lo que consideramos que este estudio tiene las características de un estudio descriptivo.

Estadificación

Para este estudio, los pacientes con Rbdomiosarcoma infantil variante embrionario y alveolar fueron agrupados basados en la estadificación pronóstica o grupos de riesgo empleada por el servicio de Oncología pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría así como la clasificación empleada por el Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRS) estadio TNM pre tratamiento: (Tab.1)(Tab.2)(Tab.3)

TNM Estadificación Pronóstico (Tabla 1.)

Pronóstico	Etapa	Grupo	Sitio	Tamaño	Histología	*Mts	Ganglios
Excelente (>85%)	1	I	Favorable	a o b	Embrionario	No	N0
	1	II	Favorable	a o b	Embrionario	No	N0
	1	III	Orbita	a o b	Embrionario	No	N0
	2	I	Desfavorable	a	Embrionario	No	N0 o Nx
Muy bueno (70-85%)	1	II	Favorable	a o b	Embrionario	No	N1
	1	III	Orbita	a o b	Embrionario	No	N1
	1	III	Favorable	a o b	Embrionario	No	N0,N1, Nx
	2	II	Desfavorable	a	Embrionario	No	N0, Nx
	3	I o II	Desfavorable	a	Embrionario	No	N1
	3	I o II	Desfavorable	b	Embrionario	No	No,N1,Nx
Bueno (50-70)	2	III	Desfavorable	A	Embrionario	No	N0 o Nx
	3	III	Desfavorable	a	Embrionario	No	N1
	3	III	Desfavorable	a	Embrionario	No	N0, Nx, N1
	1,2,3	I,II,III	Fav o Desfav	a o b	Alveolar	No	N0, N1, Nx
	4	I,II,III,IV	Fav o Desfav	a o b	Embrionario	Si	N0, N1
Malo (<30%)	4	IV	Fav o Desfav	a o b	Embrionario	Si	N0 o N1
	4	IV	Fav o Desfav	a o b	Alveolar	Si	N0 o N1

*Mts : metástasis

TNM Estadificación Pretratamiento (IRSG) (Tabla 2.)

Estadio	Sitios	T	Tamaño del tumor	N	M
I	Orbita Cabeza y cuello (excluido parameningeo)	T1 ó T2	a ó b	N0, N1 ó N2	M0
II	Vejiga / próstata Extremidades Cabeza y cuello parameningeas Otras (incluido tronco, retroperitoneo, etc.)	T1 ó T2	a	N0 ó Nx	M0
III	Vejiga / próstata Extremidades Cabeza y cuello parameningeas Otras (incluido tronco, retroperitoneo, etc.)	T1 ó T2	a b	N1 N0, N1 ó Nx	M0
IV	Todas	T1 ó T2	a ó b	N0 ó N1	M1

IRSG: Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group

Definición de Clasificación TNM ⁵⁴ (Tabla 3.)

Clasificación	Descripción
Tumor	
T1	Confinado a sitio de origen anatómico
a	<5 cm diámetro
b	>5 cm diámetro
T2	Extensión y/o fijación a tejido
a	<5 cm diámetro
b	>5 cm diámetro
linfonodos regionales	
N0	Linfonodos regionales no envueltos clínicamente
N1	Linfonodos regionales clínicamente envueltos por neoplasia
Nx	Status clínico de linfonodos regionales desconocido (especialmente en sitios que imposibilitan la evaluación de linfonodos)
Metástasis	
M0	No metástasis
M1	Metástasis presente

METODOLOGÍA

Selección de pacientes

El trabajo siguió el siguiente protocolo de análisis bidimensional (Tab. 4) posterior a la estandarización de los métodos de colección, procesamiento y generación de 2-DE.

Colección de la muestra

Los métodos comúnmente utilizados para la colección completa de saliva incluyen escurrimiento, escupir, succión y método absorbente.

Protocolo escurrimiento

- Colección entre 9:00am y 11:00am.
- Abstenerse de ingerir alimentos y/o líquidos por lo menos 90 min antes de la colección.
- Si aplica, detener el uso de medicamentos o sustancias que puedan afectar la secreción.
- Enjuagar la boca con agua desionizada (3 veces) previa colección.
- Colectar saliva sin estimulación durante 10 min. en tubos cónicos estériles de 50ml.
- Colocar inhibidor de proteasas ROCHE (40ul/ml de saliva)
- Colocar en el vortex (2 min. máxima velocidad).
- Mantener en hielo durante su manipulación para estabilizar enzimas.
- Centrifugar 5 min. a 10,000g. ¹⁴

PROCEDIMIENTO	TÉCNICA
1. Cuantificación de proteínas	Método de Bradford
2. Obtención de pH	Tiras reactivas pH 3-10
3. Generación de mapas proteicos de RMS	2-DE
4. Generación de mapas proteicos de controles	2-DE
5. Captura y Análisis de los 2-DE	Typhoon(captura) 2-D platinum (análisis)
6. Identificación de proteínas	Fingerprint por MALDI-ToF/MS

Tabla 4. Pasos generales del análisis bidimensional

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es uno de los pasos cruciales para que la separación de proteínas sea de alta calidad de resolución en mapas 2-DE. Las muestras requieren estar libres de sales y otros compuestos como detergentes iónicos, ácidos nucleicos, lípidos y compuestos fenólicos además de tener concentraciones proteínicas apropiadas.

Para cumplir con este requerimiento es necesario disminuir la polaridad del disolvente en el que se encuentran las proteínas mediante compuestos menos polares como disolventes orgánicos los cuales favorecerán el grado de hidratación de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación.⁵⁵

Con la intención de comparar y seleccionar el precipitante proteínico así como el método de precipitación que permita obtener la mayor recuperación proteica y que facilite generar perfiles proteínicos bidimensionales reproducibles y altamente resolutivos se compararon los siguientes métodos:

Método A: precipitación 12 h con acetona basados en la modificación metodológica descrita por Jiang et al (2004).⁵⁶ 500ul de saliva se mezclaron con tres volúmenes de acetona fría (90%v/v). Se mezcló con un vortex y se incubó toda la noche a -20°C; a continuación se centrifugó a 15,000 x rpm, 4°C por 30 min, con la intención de que las sales, detergentes, lípidos y ácidos nucleicos sean eliminados mediante centrifugación. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con acetona a -20°C, obteniendo con ello proteínas libres de sustancias que interfieren con el isoelectroenfoco. La pastilla resultante de los lavados fue resuspendida en una solución base de agentes caotrópicos compatibles con la primera dimensión (urea 9M, CHAPS 4%). Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se evaluó el rendimiento de la técnica.

Método B: precipitación 1 hr con acetona, se siguió el mismo protocolo del método A con la única variación del tiempo de exposición al agente precipitante.

Método C: precipitación 12 hrs con ácido tricloro acético (TCA)/acetona/Diotriterol (DTT) volumen a volumen muestra. Se mezcló por vortex e incubó toda la noche a -20°C, a continuación se centrifugó a 15,000 x rpm, 4°C por 30 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó 2 veces con 200 ul de

acetona conteniendo 20 mM de DTT, posteriormente, se rehidrató y cuantificó como se describió previamente.

Método D: precipitación 1 hr con (TCA/acetone/DTT), se siguió el mismo protocolo del método C con la única variación del tiempo de exposición a los agentes precipitantes.

Método E: precipitación comercial con estuche de reactivos “2-D Clean up kit” (Amersham, Piscataway USA) que consiste en la purificación de las proteínas, precipitándolas con ácido tricloroacético (TCA) en frío.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Primera dimensión

La hidratación de las tiras se realizó durante 10 a 18 h, a un volumen final de 125 μ l mezcla de muestra, anfolitos al 2% en un volumen final de buffer “destreak”. El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en un sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Bio-Science Sweden), con un protocolo de 4 pasos: (i) 300V - 200Vh, ii) 1000V – 300Vh, iii) 5000V – 4000Vh y iv) 5000V – en 30 min). Las tiras se almacenaron a -70°C en seco. Posteriormente, se equilibraron durante 30 min en dos etapas: 15 min en 1.0 ml de DTT 70 mM en amortiguador desnaturalizante de equilibrio (Tris 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, glicerol 30% SDS 2%) seguido de 15 min en 1 ml de Iodoacetamida 140 mM en el mismo amortiguador desnaturalizante de equilibrio. (Tabla. 5)

Segunda dimensión

La segunda dimensión SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, de 1.5 mm de grosor, preparados en el laboratorio antes de cada corrida empleando la solución comercial de acrilamida-bisacrilamida 40%. Las tiras resultantes del isoelectroenfoque se insertaron en la parte superior de cada gel y la electroforesis se realizó en cámaras de electroforesis Protean III (Bio Rad, Hércules, CA, USA). El tiempo de corrida fue de 2 h, una hora a 80 V y la otra a 100 V. Después de la segunda dimensión se procedió a fijar el gel para su tinción mediante Deep purple. (Tabla. 5)

Tabla 5. Procedimiento 2-DE.

PRIMERA DIMENSION	1. Hidratación de tiras	10-18 h
	2. Isoelectroenfoque (IEF)	Con Sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Bio-Science Sweden), con protocolo de 4 pasos: 1er gradiente: 300 V – 200 Vh 2do gradiente: 1000 V – 300 Vh 3er gradiente: 5000 V – 4000 Vh 4to gradiente: 5000 V – en 30 min
	3. Almacenamiento tiras	-70°C en seco
	4. Equilibración	Durante 30 min. en dos etapas: 1ª: 15 min. en 1.0 ml de DTT 70 mM en amortiguador desnaturante de equilibrio (Tris 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, glicerol 30% SDS 2%). 2ª: 15 min. en 1 ml de Iodoacetamida 140 mM en el mismo amortiguador de desequilibrio.
SEGUNDA DIMENSION	1. Preparación de geles desnaturantes poliacrilamida 10%, 1.5 mm grosor.	Cámara de electroforesis Protean III (Bio Rad, Hércules, CA, USA).
	2. Corrida	Tiempo total 2 h (1ª hora a 80 V) (2ª hora a 100 V)
	3. Fijación del gel	En etanol 10%, ácido acético al 7.5%, 25 a 50 ml por gel toda la noche. Posteriormente lavado con agua desionizada durante 30 min.
TINCION DEEP PURPLE	Tinción durante 1 hora en la oscuridad	Solución que contiene una parte del colorante fluorescente Deep purple y 200 partes de Carbonato de sodio Na ₂ CO ₃ 200 mM.
	Lavado	Lavado 3 veces con 25 ml de ácido acético al 7% durante 15 min cada vez.
	Escaneo	En Typhoon 9400 (Fluoresceina filtro láser verde 532 nm, sensibilidad PMT de 500-600 V, 50 micrones, tiempo escaneo por gel de 9:50 min). longitud de onda de excitación a 532 nm, filtro Green Lasser, emisión con filtro 560 LP o 610 BP. Resolución de 100 micrones.
ANALISIS DE LOS PATRONES DE PROTEINAS EN 2-DE		

Análisis de los Patrones de Proteínas en 2-DE

El análisis de proteínas requiere la generación de un gel maestro que sea representativo del total de los geles individuales correspondientes a cada caso, se realizaron varias repeticiones con la intención de que para cada caso al final tuviéramos un triplicado con la mínima variación requerida para su análisis. Los datos obtenidos mediante el programa Image Master 2D Platinum ver 6.0. GE Healthcare propios de cada paciente y control correspondiente se incluyeron para la generación del gel maestro *in silico* 2-DE; la presencia de cada spot que sirvió para definir el gel maestro fue validado por quintuplicado para su inclusión

Para analizar la expresión diferencial generada a partir de 2-DE, se digitalizaron los geles con el sistema de escaneo Typhoon 9400 series (GE Healthcare) y se realizó el análisis de imagen con el programa Image Master 2D Platinum versión 6.0.

Así mismo, se recurrió a otra estrategia analítica que complementara el análisis de expresión: 2-Dimensional Fluorescence Difference Gel (2-D DIGE) empleando el protocolo CyDye DIGE Fluor Labelling (Amersham Biosciences). En esta técnica se emplearon colorantes fluorescentes con diferentes pesos moleculares y cargas eléctricas derivados de Cy3 ($C_{37}H_{44}N_4O_6S$) y Cy5 ($C_{38}H_{44}N_4O_6S$) para marcar de forma covalente las proteínas de las dos muestras que se compararon: Cy3 para el maestro de casos, Cy5 para el maestro de controles. Se mezclaron las muestras una vez marcadas las proteínas con los colorantes y se separaron en un único 2-DE.

Posteriormente, mediante el equipo Typhoon 9400 en modo de imagen variable para imágenes avanzadas y con ayuda del programa Differential Analysis Software (DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v 7.2 – GE Healthcare, las señales fluorescentes de los colorantes Cy3 y Cy5 fueron separadas, cuantificadas y normalizadas para determinar el cociente de marcaje entre las muestra, esto permitió generar comparaciones cuantitativas.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas usando el método de *fingerprint* en equipo MALDI-ToF.

Existen varias estrategias para la identificación de proteínas a partir de los datos de espectrometría de masas, de estos los principales analizadores que se utilizan en los estudios proteómicos son los de trampa iónica, los de tiempo de vuelo (time-of-flight, TOF), los cuádruplos y los de resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier.

Las proteínas cuya expresión en 2-DE del proteoma de casos reflejaron un cambio cualitativo respecto al proteoma de controles fueron identificadas mediante el método de *fingerprint* y posterior análisis con espectrometría de masas por desorción asistida por láser acoplado a tiempo de vuelo (MALDI-ToF-MS), mismos que se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Pediatría.

Para realizar el *fingerprint* los “spots” de proteína se cortaron con una punta de micropipeta y se colocaron separadamente en tubos eppendorf. Los fragmentos de gel fueron desteñidos con una solución de acetonitrilo al 50 % en 2.5 mM de bicarbonato de amonio; los fragmentos se incubaron dos veces en esta solución por 2 h a 25° C. Posteriormente, los fragmentos de gel se deshidrataron completamente con un sistema de vacío; Al término de la desecación, los geles se incubaron con 10 mM de DTT durante 30 min a 25° C para reducir todas las proteínas.

Al término de la incubación, el DTT fue removido e inmediatamente los geles se incubaron con 100 mM de iodoacetamida por 30 min con la finalidad de alquilar a las proteínas en sus residuos de cisteínas. Al término de la incubación, la iodoacetamida que no reaccionó se removió.

Después de este proceso, los fragmentos de gel se incubaron por 12 h a 37° C en una solución de bicarbonato de amonio conteniendo la proteasa tripsina. Este proceso permitió tripsinizar completamente a las proteínas contenidas en el interior del gel. Posterior a la digestión, los péptidos se extrajeron del gel para concentrarlos mediante evaporación.

Para la identificación de las proteínas, los péptidos obtenidos fueron mezclados con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 50 % de acetonitrilo / 0.1 % de ácido trifluoroacético. Esta mezcla permitió obtener una solución cristalina que favorece la desabsorción de los péptidos por el equipo de masas. Las muestras se colocaron en el MALDI-ToF-MS y después de ionizarlas se establecieron las relaciones masa/carga que sirvieron para generar una lista de las masas de los péptidos; esta lista fue utilizada para identificar a cada una de las proteínas y las modificaciones postraduccionales existentes en las bases de datos del NCBI y, específicamente, en aquellas del genoma humano, mediante el uso del programa ProteinLynx, las bases de datos utilizaron un formato tipo FASTA, mismo que se obtuvo utilizando el servidor de UNIPROT. Alternativamente, se utilizó el programa MASCOT (Matrix Science, LTD., London, United Kingdom; <http://www.matrixscience.com>); lo anterior con la finalidad de corroborar los datos obtenidos con ProteinLynx.

Para el análisis estadístico de la identificación de proteínas por el método de fingerprint utilizando MALDI-ToF/MS, se utilizó el algoritmo de Mowse.⁵⁷ Dicho algoritmo compara el valor calculado del peso molecular (PM) de cada péptido contra la de una base de datos de secuencias de proteínas. El algoritmo asigna un valor para cada péptido evaluado y para cada secuencia de proteína evaluada. Este valor, designado como valor "M", representa la probabilidad de que una proteína se identifique exitosamente, respecto a la probabilidad de ser asignada simplemente por azar. El valor "M" es inversamente proporcional a una asignación exitosa de identificación; es decir, a mayor valor "M", menor probabilidad de éxito. Por tanto, al valor "M" se le aplica la operación $[-10 \times \log_{10}(P)]$, donde "P" es el valor de "M" con mayor probabilidad de éxito. Así, un valor "P" de 10^{-20} se reporta como 200. De esta forma, el valor de la operación de "P" es directamente proporcional a la probabilidad de que una proteína sea identificada exitosamente.

RESULTADOS

El protocolo contó con el dictamen aprobatorio de la Comisión de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Así como el Dictamen aprobatorio del Comité de investigación y ética del Instituto Nacional de Pediatría, INP número: 382010.

El total de pacientes al que se tuvo acceso fue de 16 que fueron reclutados durante el periodo comprendido del 8 de junio del 2010 al 27 de marzo del 2012 a través del Servicio de Oncología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría. Sin embargo, tan solo 12 fueron incluidos en el estudio por cumplir con los criterios de inclusión. Los individuos control para este estudio fueron reclutados en el mismo periodo antes descrito.

No.	Género	Edad (años)	Subtipo histológico	Localización	TNM
1	M	4	Embrional	Órbita izquierda	III
2	F	7	Embrional	Seno maxilar derecho	III
3	M	9	Alveolar	Masetero derecho	III
4	F	6	Alveolar	Órbita derecha	III
5	M	11	Alveolar	infra temporal	IV
6	M	11	Alveolar	Carrillo izquierdo (boca)	IV
7	F	5	Alveolar	Nasogeniano	III
8	M	11	Alveolar	Parameningeo temporal izq.	IV
9	M	6	Embrional	Nasogeniano	II
10	F	6	Alveolar	Parameningeo seno izq.	III
11	M	7	Embrional	Fosa nasal	IV
12	M	11	Alveolar	Seno nasal	IV

Tabla 6. Frecuencia de subgrupos de Rbdomiosarcomas

La media de edad de los niños con cáncer y sus controles fue de 7.2 años con un rango de 4-11 años, una mediana de 7 años y una moda de 11 años; la proporción fue de 60% de hombres y el subtipo histológico predominante fue de 72.7% correspondiente al tipo alveolar. Tabla 6

Edad	
Media	7.2 años +/- 2.5
Mediana	7 años
Moda	11 años
Rango	4-11 años
Proporción de género	60% hombres
Proporción histológica	72.7% alveolar
pH saliva (media)	6.5 pH

Estandarización metodológica:

- Obtención de muestra
- Procesamiento proteínico
- Mapas 2-DE

El protocolo de colección de saliva para el estudio se definió con base en el resultado obtenido de la comparación de la técnica “estimulada” mediante mascado de papel cerado contra una técnica “no estimulada”, con la intención de evaluar el volumen de obtención y la abundancia de proteínas.

El promedio de los volúmenes obtenidos de cada técnica fue de 5 ml para la técnica “no estimulada” y de 4.5 ml para la técnica “estimulada” (carriles A y B respectivamente, Fig.11)

Las proteínas obtenidas de los dos métodos fueron separadas en una electroforesis desnaturalizante, en donde se aprecia claramente una diferencia en el patrón y número de bandas de cada carril, en un rango de pesos moleculares de 240 a 25 kDa, es claro que la muestra obtenida por la técnica sin estimulación (carril A, Fig. 11) tiene un mayor número de bandas así como una mayor intensidad respecto a la muestra obtenida con estimulación (carril B, Fig. 11). La densidad de las bandas correspondientes a cada carril fue analizada mediante el programa ImageQuant 5.2.

Abundancia y Diversidad de proteínas

La abundancia y diversidad de proteínas fue mayor y estadísticamente significativas con el método “no estimulado” (media 63510 pixeles \pm 860.7) en comparación con la técnica “estimulada” (media 53650 pixeles \pm 739.7) (Fig.12)

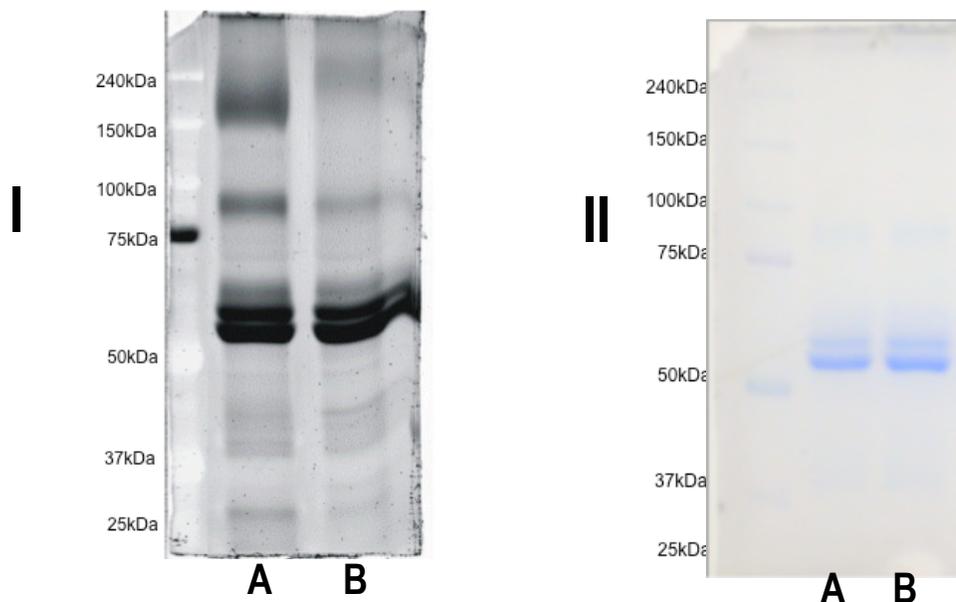


Figura 11. Electroforesis SDS. Separación de muestras proteicas de saliva obtenidas por diferentes métodos de colección de saliva total. I) Electroforesis desnaturalizante teñida con Deep purple. El carril A corresponde al método no estimulado, el carril B al estimulado. II) Electroforesis desnaturalizante teñida con Azul de Coomasie. El carril A corresponde al método no estimulado, el carril B al estimulado. En todos los casos la masa de carga fue de 10ug de proteína para cada carril.

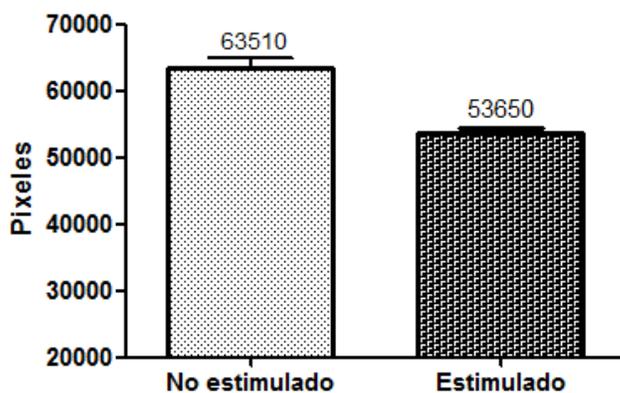


Figura 12. Histograma de densidad de los métodos de colección de saliva. Comparación de densidades por carril $t=8.696$ $p < 0.0010$.

Rendimiento de proteína resolubilizada

La recuperación de proteínas entre los métodos de precipitación A,B,C,D y E fueron evaluados y comparados, demostrando que los rendimientos de los métodos B y D son mayores. Al comparar el rendimiento entre todos los grupos, los métodos B y D no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 7). El método B (descrito en materiales y métodos) dio el más alto porcentaje de recuperación (67.96%) seguido del método D (65.69%). Los métodos A,C y E dieron menor rendimiento: 44.98, 49.51 y 42.07 % respectivamente (Fig. 13).

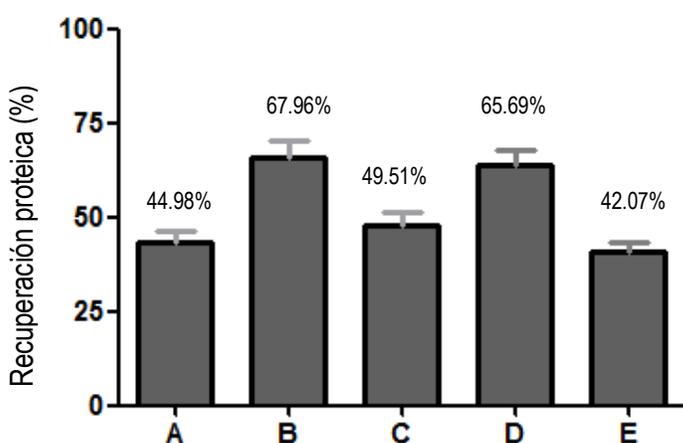


Fig. 13 Porcentajes de recuperación proteínica. Histograma comparativo de métodos de precipitación expresada en porcentajes de recuperación de proteína.

Método	Significancia
A vs B	< 0.05
A vs C	< 0.05
A vs D	< 0.05
A vs E	< 0.05
B vs C	< 0.05
B vs D	No significativo
B vs E	< 0.05

Tabla 7. Análisis estadístico (ANOVA) de métodos de precipitación A, B, C, D y E.

Diversidad de proteínas en muestra resolubilizada

Para evaluar la diversidad de proteínas generada por cada método de precipitación, se corrió una electroforesis desnaturalizante y los resultados fueron evaluados estadísticamente.

Los 5 métodos de precipitación (Fig.14a y 14b) reflejan un patrón de bandeo mayor que el correspondiente a la saliva sola, el patrón es directamente proporcional a la obtención de un incremento en el repertorio proteínico resultante de la precipitación proteínica previa a la electroforesis; los carriles correspondientes a los métodos C y E son los que generan una mejor definición de bandas.

Con la intención de definir el grado de sensibilidad para la detección de bandas y posteriormente de spots se decidió evaluar de manera subjetiva las técnicas de tinción de plata vs deep purple (materiales y métodos) en donde claramente se observa una mayor sensibilidad de la técnica de “deep purple” comparada con la técnica de plata coloidal.

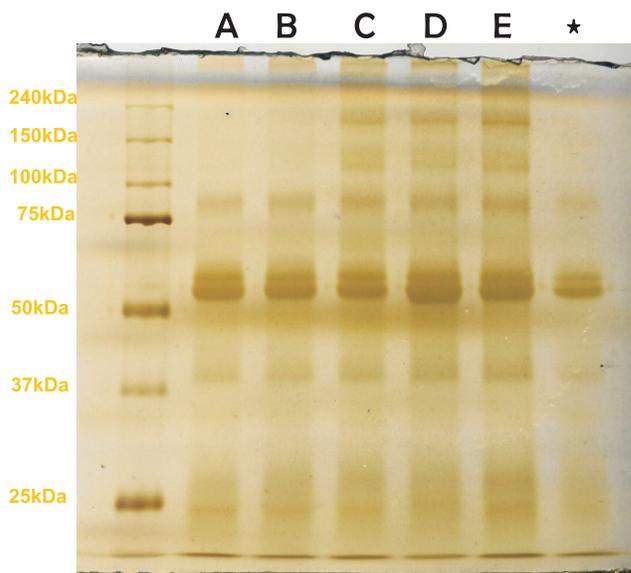
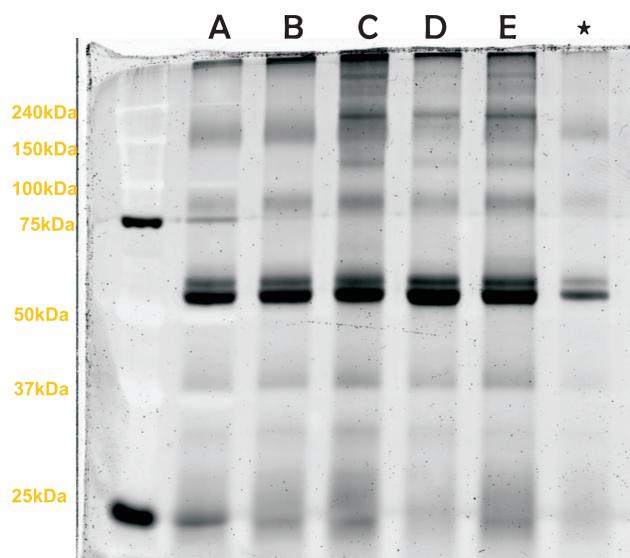


Figura 14a. Electroforesis SDS (tinción de plata). Comparación de métodos de precipitación proteínica; análisis de diversidad vs perfil de saliva sin precipitar. (*) 10 ug de proteína /carril.

Figura 14b. Electroforesis SDS (tinción con Deep purple). Comparación de métodos de precipitación proteínica; análisis de diversidad vs perfil de saliva sin precipitar (*). 10ug de proteína c/carril



Evaluación de diversidad de proteínas mediante análisis de densidad

Los carriles correspondientes a los métodos C (densidad 1230.9) y E (densidad 1067) fueron los que recuperaron una mayor diversidad de proteínas representadas por un mayor número de bandas en la electroforesis desnaturizante. Datos significativos $F= 327.58$; $gl\ 4,10$; $p<.001$ (Fig 15 y 16).

Se identificaron: 8 bandas (método A), 12 bandas (método B), 17 bandas (método C), 13 bandas (método D) y 16 bandas el (método E).

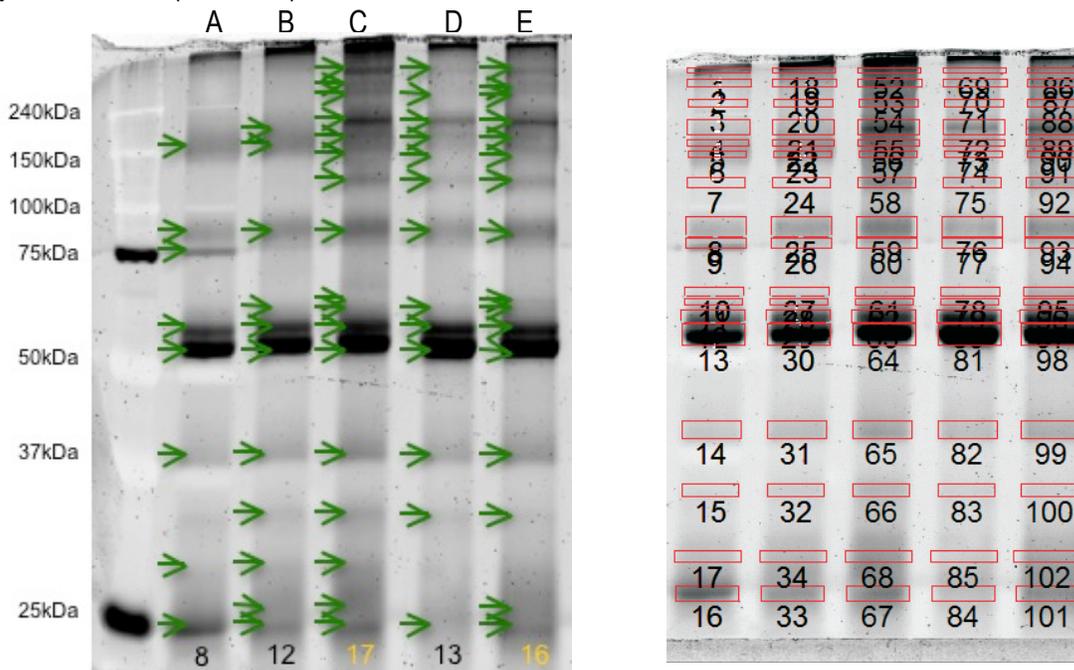


Figura 15. Electroforesis desnaturalizante. Las flechas verdes indican las bandas identificadas con el programa ImagQuant 5.2 para su posterior análisis de densidad. El panel de la derecha corresponde a la misma imagen de la izquierda. Las cajas indican las áreas en las que se evaluó la densidad óptica. La numeración corresponde a la asignación que el programa da a cada banda.

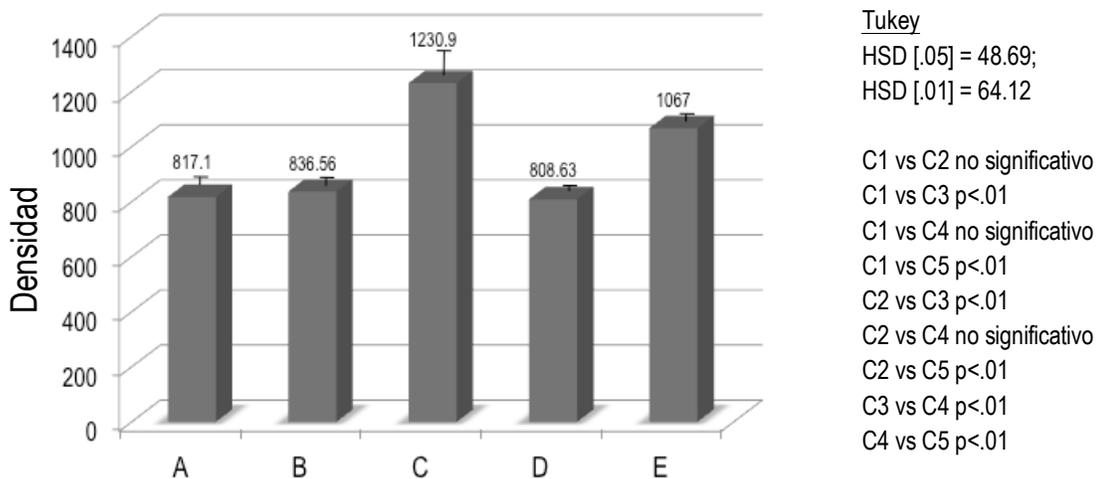


Figura 16. Histograma de rendimiento y variabilidad. Comparación de métodos de precipitación A, B, C, D y E. A la derecha se muestra la significancia de las comparaciones, los valores de HSD (diferencia absoluta entre los promedios de cualquiera de las muestras requeridas para obtener una diferencia significativa en algún nivel).

Comparación de los perfiles bidimensionales (2-DE) de los métodos de precipitación cuyos resultados en los análisis anteriores resultaron con una mayor diversidad , (métodos C y E) Fig. 17:

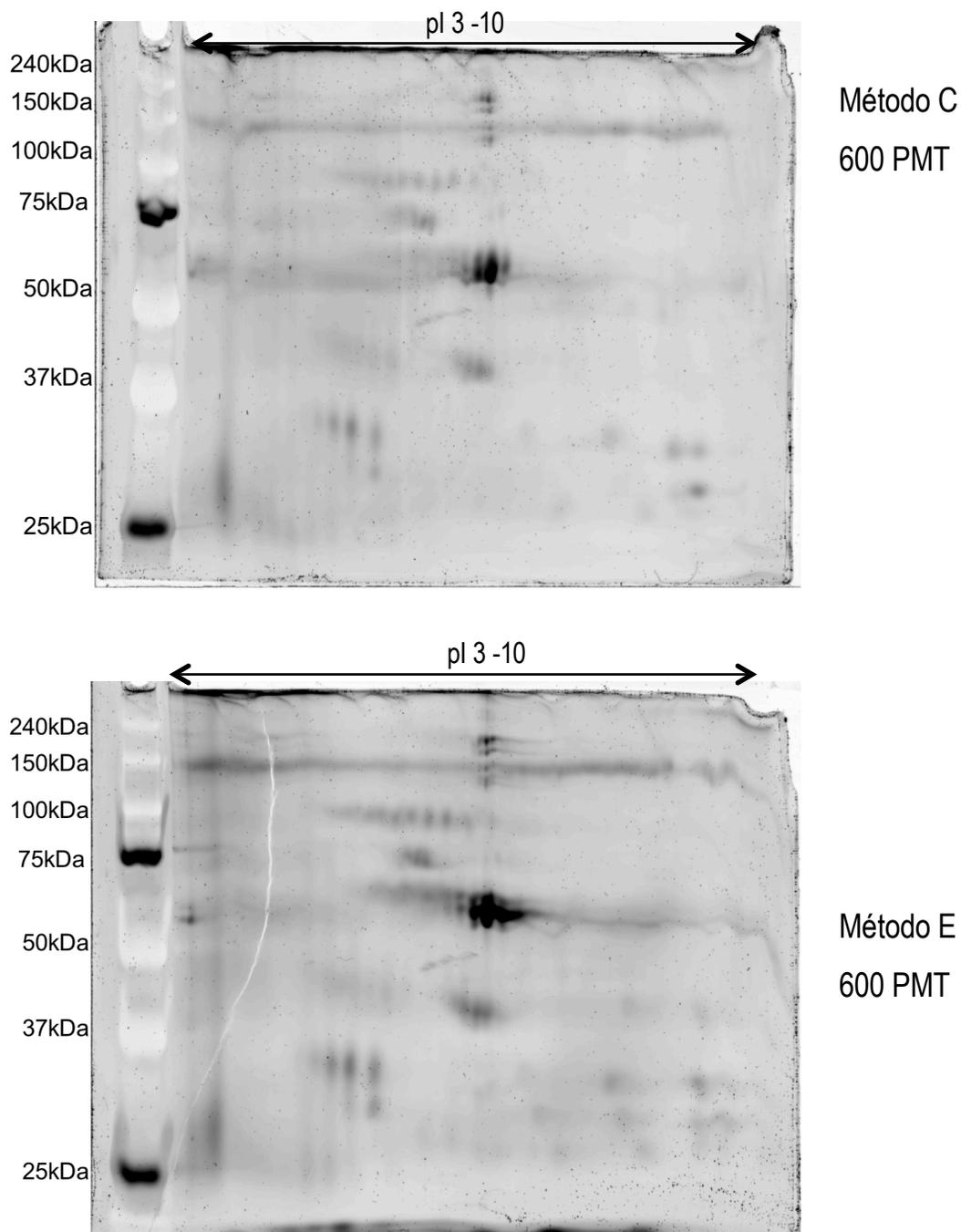


Figura 17. Comparación de los mapas proteínicos de saliva total. Geles 2-DE de los métodos C y E. Rango pH indicado en la parte superior y pesos moleculares en el lado izquierdo.

Comparación de los perfiles 2-DE entre casos y controles (Método 2-D DIGE)

Para la técnica 2-D DIGE (Fig. 18) se requirió crear un *pool* que incluyera todas las muestras de RMS (acoplada a Cy3) y otro correspondiente a controles (Cy5). La mezcla de estos dos *pools* se separó en un solo gel como se describe en materiales y métodos.

Se obtuvieron 2 imágenes, roja para Cy5 y verde para Cy3, las cuales al superponerse generan una imagen virtual (amarillo) que muestra la colocación de los spots de ambas muestras, estas imágenes se analizaron mediante el programa DeCyder™

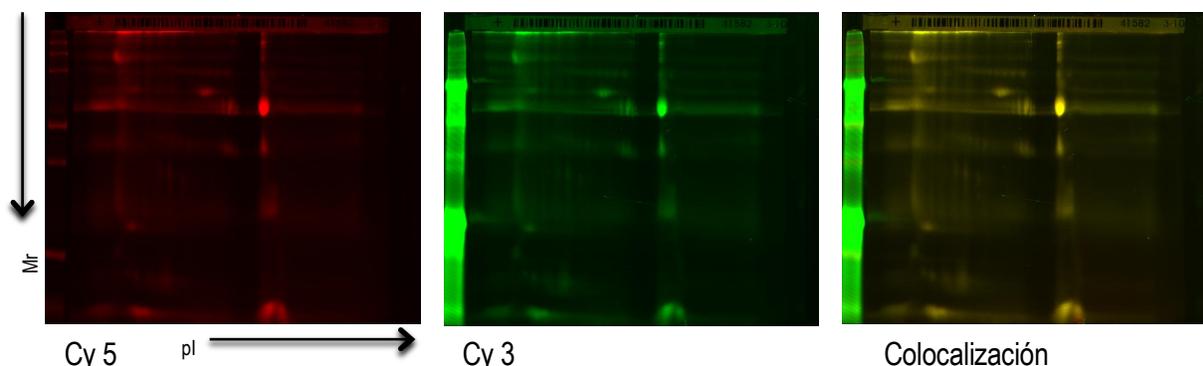
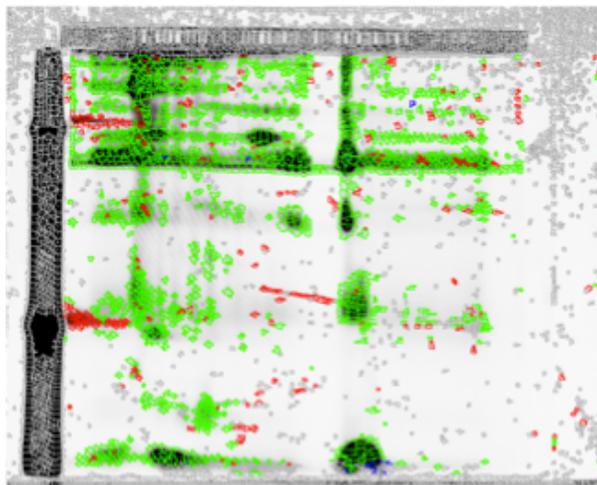
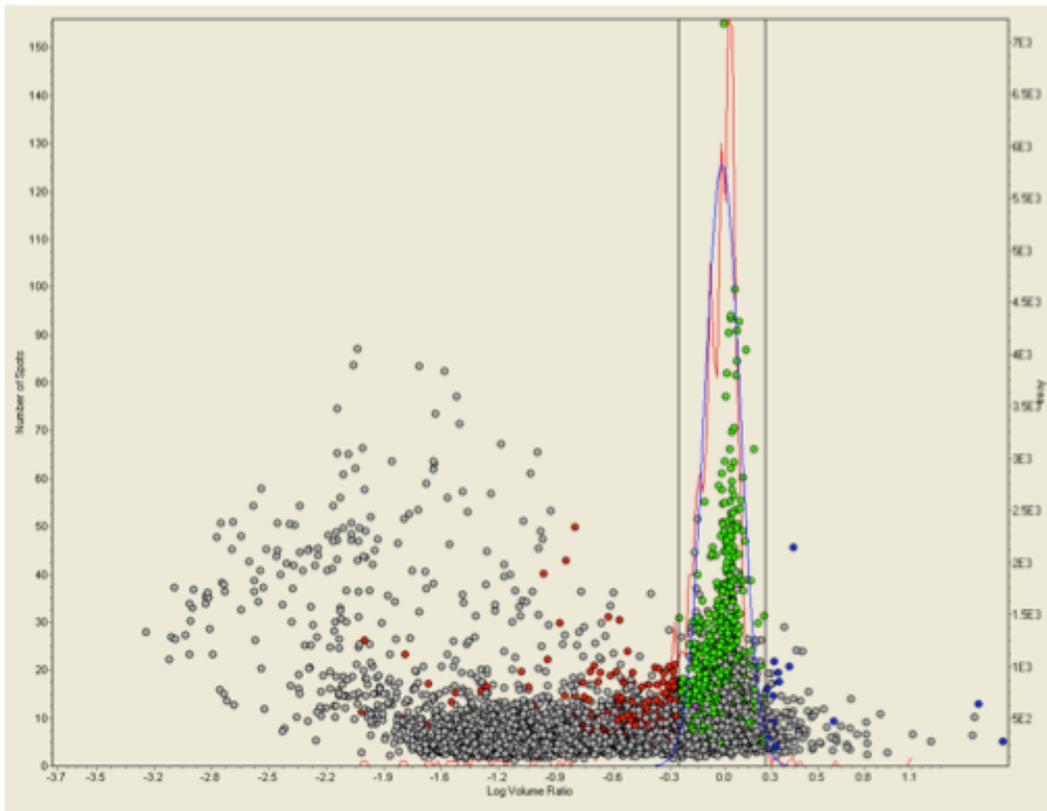


Figura 18. 2-D DIGE, *pool* de RMS marcado con Cy 5 (rojo) y *pool* controles marcado con Cy

Los resultados obtenidos del análisis comparativo entre las imágenes generadas de los geles maestros de RMS versus controles pareados, se muestran de manera cuantitativa (histograma Fig. 19), de los cuales se detectaron 1775 spots en total con ambos marcajes dentro de los límites definidos de punto isoeléctrico (3–10) y peso molecular (10–240 kDa) (suma de todos los puntos grises, rojo, verde y azules de la Fig.21).

El análisis reporta que 1473 spots, identificados en “círculos verdes” corresponden al 83.0% del total no mostraron diferencias de intensidad. 288 spots, correspondientes al 16.2 % y que aparecen como “círculos rojos” (16.2%) disminuyen y 14 spots, tan sólo el 0.8% que aparecen como “círculos azules” incrementan su expresión . (Tabla de la Fig. 19).



Histogram selections	
Scatter parameter:	Area
Threshold mode:	2 model S
Threshold:	1.75565
2 S.D.:	2.72412
Spot statistics	
Decreased:	288, [16.2%]
Similar:	1473, [83.0%]
Increased:	14, [0.8%]
Workspace information	
Detected:	8619
Included:	1775
Excluded:	6844
Picked:	0

Figura 19. Histograma de colocación RMS vs Controles (proporción logarítmica del volumen de cada spot “eje x” contra número de spots “eje y”). Cada spot está representado con un color, verde para aquellos cuya densidad permanece igual, en rojo los spots que disminuyeron su expresión y azul aquellos spots cuya expresión mostró incremento en sobre expresión.

Comparación de los perfiles 2-DE entre casos y controles (Tinción Deep purple)

Debido a que los 1775 spots identificados mediante la técnica 2-D DIGE resultan de la detección global de la fluorescencia presente en el gel, el programa de análisis no discrimina en base a las características de “saliencia, volumen y área” que permiten distinguir proteínas de artefactos. Resolvimos estas limitaciones generando réplicas de 2-DE de la misma muestra teñidos con Deep purple y con la generación de un gel maestro in silico, para que el programa proveyera la información de pI y M_r de cada spot, se alimentó con las posiciones de 7 marcadores de peso M_r , 2 de pI y se fijó el mismo punto de referencia interno para todas las muestras.

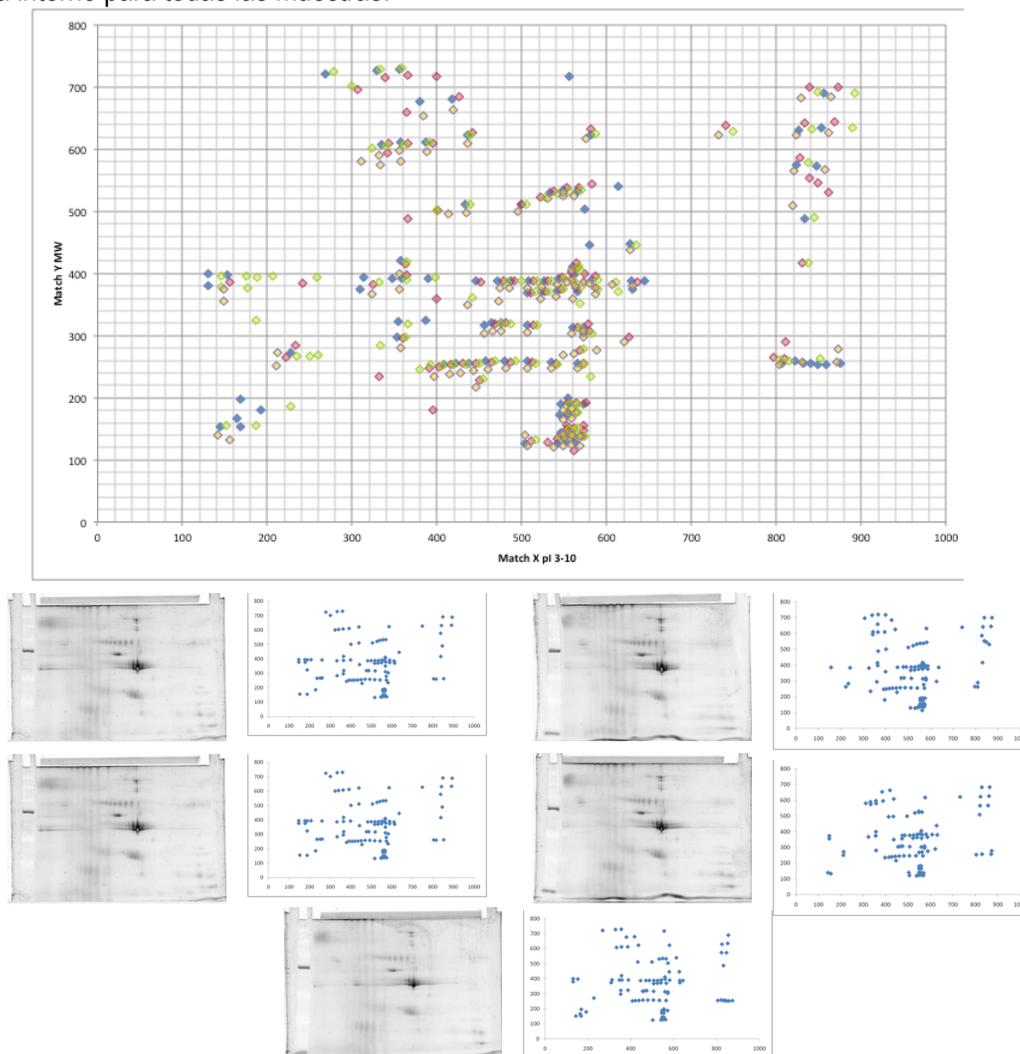


Figura 20. Generación de Gel maestro in silico RMS. Cada 2-DE en la porción inferior de la imagen está representado por su contraparte gráfica (pI y M_r), los cuales al promediarse y ser validados generan el gel maestro virtual (imagen superior). Cada color representa los datos confirmados de cada uno de los 5 geles individuales.

Para llevar a cabo la validación de spots fue necesaria la generación de un gel maestro biológico representativo de todas las características inter- e intra-individuales, así como la generación de un gel maestro virtual (in silico) que de igual forma reflejara los promedios de pI y Mr de cada spot, obtenidos del análisis 2-DE de cada individuo. Cada spot incluido en el gel maestro in silico se consideró validado si estaba presente en 3 de 5 geles. (Fig. 20)

Cada spot de cada 2-DE generado, fue evaluado tridimensionalmente en base a los criterios de saliencia “curtosis”, área y volumen propios de una mancha proteínica, para descartar falsos positivos. (Fig. 21)

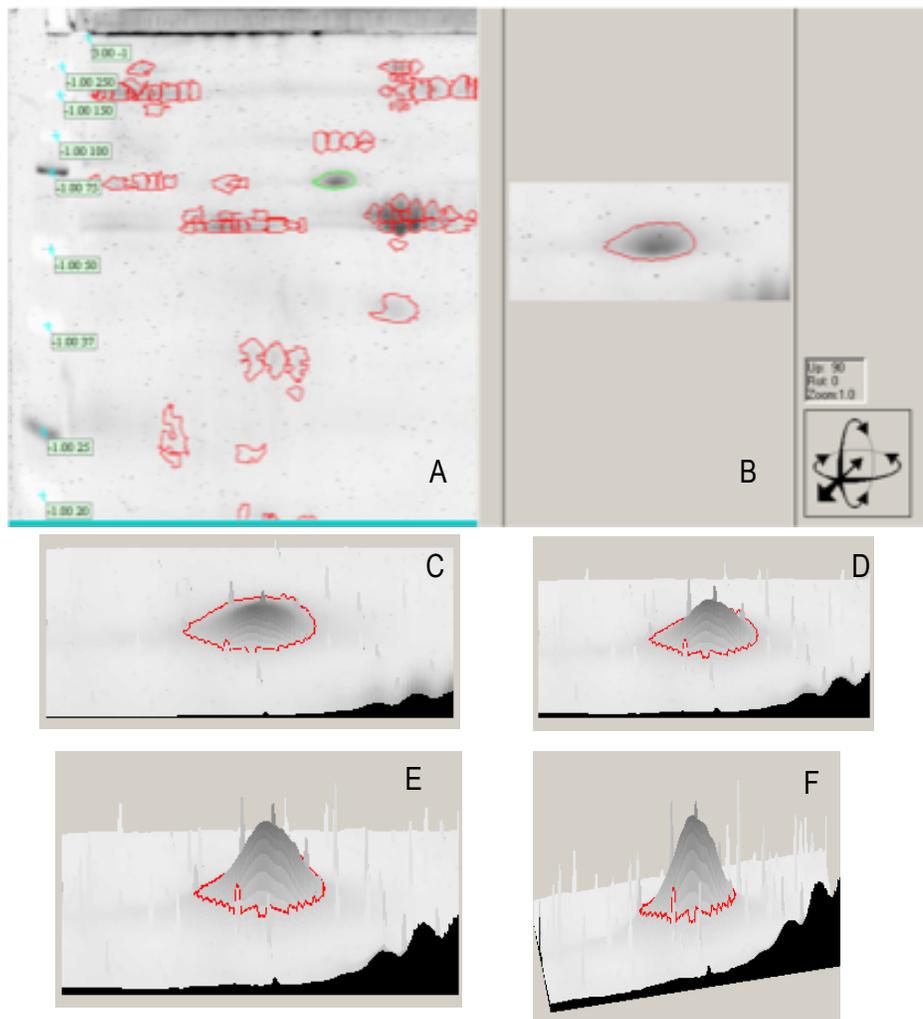


Figura 21. Ejemplo de la forma de validación tridimensional de cada spot identificado en los 2-DE con base a sus características de saliencia (curtosis), área y volumen. A) mapa 2-DE con spots a validar. B) magnificación del spot seleccionado en verde de imagen A. C, D, E y F) secuencia tridimensional de la rotación del mismo spot.

Este tamizaje realizado con criterios astringentes nos permitió identificar 102 spots de alta reproducibilidad (Fig. 22): 67 de ellos constituyeron el perfil proteínico de los controles (cuadros en color rojo) y 35 spots constituyeron el perfil proteínico de los RMS (rombos azules). Teniendo por tanto 3 spots con expresión diferencial en casos, 35 spots con expresión diferencial en controles y 32 spots que coinciden en ambas condiciones. Fig. 23

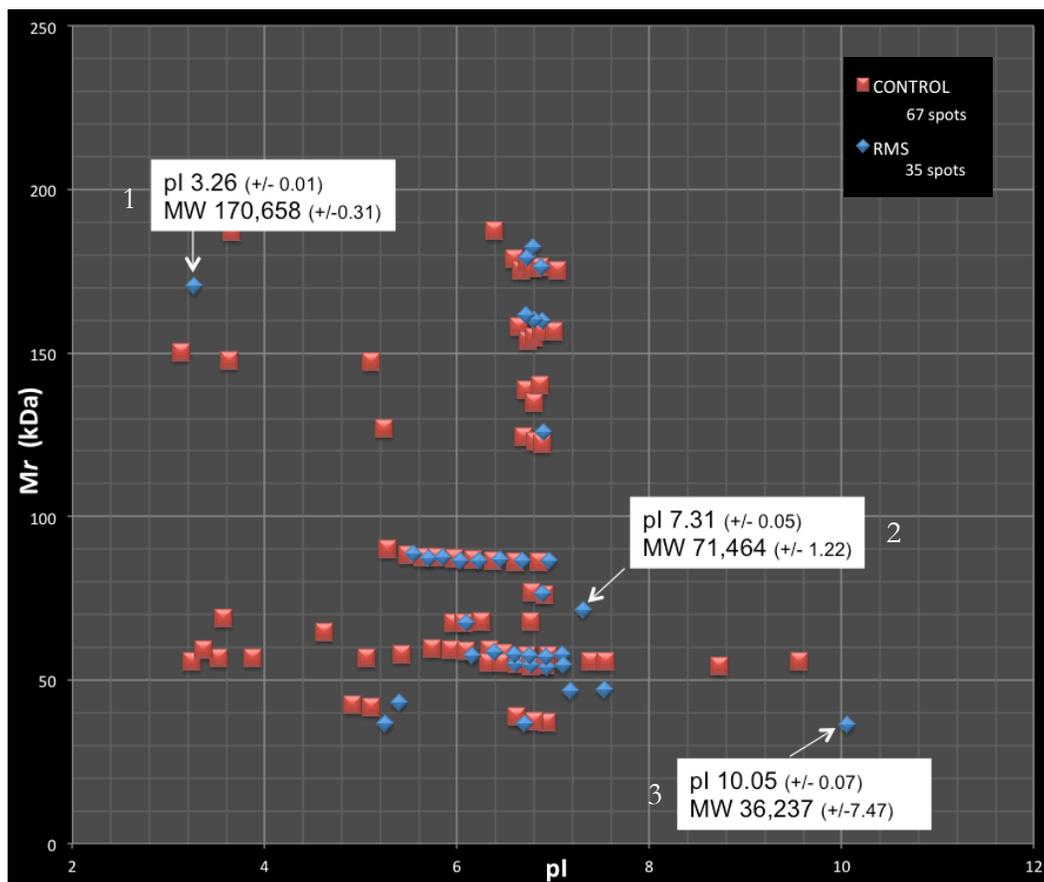


Figura 22. Comparación de gels maestros in silico de RMS (rombos azules) y controles (cuadros rojos), cada spot representa el promedio de pI y Mr objetivos generados. previamente.

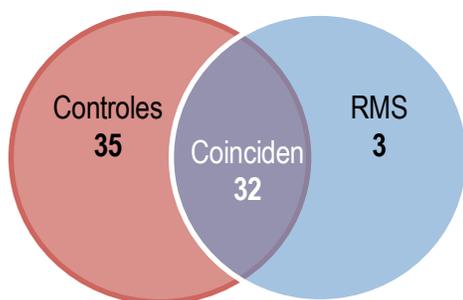


Figura 23. Diagrama de Venn, que muestra la expresión diferencial de los spots al comparar controles vs RMS

En general, el patrón de distribución entre RMS y controles fue similar, sin embargo, se identificaron 3 spots (1, 2, 3) en la imagen del gel maestro de RMS que no están presentes en la imagen del gel maestro de controles (pI / Mr aparentes): 1 (3.26 / 170,658), 2 (7.31 / 71,464) y 3 (10.05 / 36,237) respectivamente, que se indican con una flecha en la fig. 22.

Se extrajeron y procesaron 9 fragmentos del gel en forma individual de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos para ser sometidas a análisis por espectrometría de masas. La tabla 8 muestra la posible identidad de estas 3 proteínas: el primer fragmento reveló la presencia de desmogleina-3 y trombospondina-1, con coberturas de 36 y 29% respectivamente. El segundo fragmento de gel reveló la presencia de la proteína rica en prolina con una cobertura del 21.8 %, mientras que en el tercero se identificó la presencia de mucina 7 con una cobertura del 15.9%. Como control positivo se identificó alfa-amilasa 1 con una masa observada de 57,730 kDa y un pI de 6.5 y una cobertura del 100%. El instrumento fue calibrado previamente con PEG's.

Tabla 8. Proteínas identificadas del mapa 2-DE de RMS, saliva.

Spot	Proteína	M _r (kDa)		pI		Gen	Uniprot	Método de identificación	
		Teor.	Apar.	Teor.	Apar.			Base datos	
1	Desmogleina-3	107,465	170.658 +/- 0.31	4.7	3.26 +/- 0.01	DSG3	P132926	MALDI	saliva humano
	Trombospondina-1	129,299	170.658 +/- 0.31	4.5	3.26 +/- 0.01	THBS1	P07996	MALDI	saliva humano
2	Proteína rica en prolina-1	27,199	36.237 +/- 7.47	10.7	10.0 +/- 0.07	PROL1	Q99935	MALDI	saliva humano
3	Mucina-7	39,134	71.464 +/- 1.22	9	7.31 +/- 0.05	MUC7	Q8TAX7	MALDI	saliva humano

Los valores teóricos (Teor.) de M_r y pI fueron calculados. Los valores aparentes (Apar.) de M_r y pI fueron calculados usando un promedio de deformación vectorial para cada gel en el quintuplicado del gel maestro, coordenadas obtenidas en el análisis con el programa Image Master 2D Platinum ver 6.0. GE Healthcare.

Perfiles proteínicos de muestras representativas de RMS III y IV

El análisis presentado en la sección anterior agrupó a todos los pacientes con RMS incluidos en este estudio, incluyendo 6 en estadio TNM III y 5 en estadio TNM IV.

Dado que el número de muestras de cada estadio fue limitado no resultó posible hacer una comparación formal entre subgrupos. Por esta razón se presentan sólo de manera descriptiva la comparación entre la imagen del gel generado con el *pool* de las 6 muestras del estadio III contra la imagen del *pool* de las 7 muestras del estadio IV. (Fig. 24)

Un análisis visual nos permitió identificar un total de 5 zonas en ambos geles con variaciones en la expresión proteínica, dentro de las cuales observamos cambios en 13 spots identificados como: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, C4, D1, D2 y E1. (Fig. 24)

La tabla 9, resume las coordenadas aparentes de pI y M_r para cada spot, así como su asociación (presencia o ausencia) con el estadio.

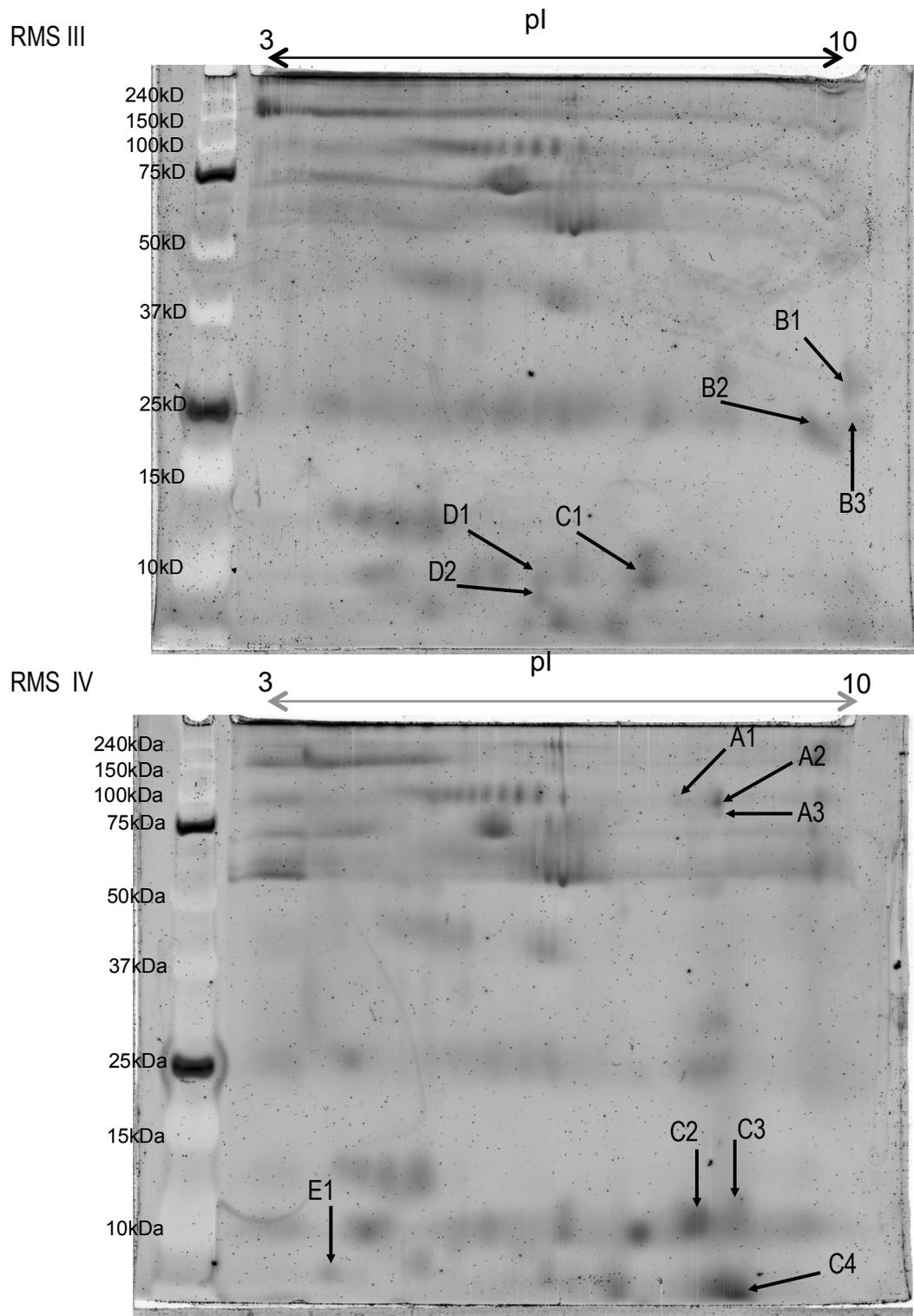


Figura 24. Geles 2-DE de saliva correspondientes a los pacientes con RMS estadios III y IV (TNM). Las flechas indican la posiciones relativas de los spots que presentan variación entre estadios. Las letras (A-E) corresponden a las 5 regiones definidas arbitrariamente en donde se presentan variaciones.

Id spot	Estadio III	Estadio IV
A1	-	7.75 / 100
A2	-	8.25 / 100
A3	-	8.25 / 80
B1	10 / 27	-
B2	9.6 / 22	-
B3	10 / 22	-
C1	7.55 / 11	-
C2	-	8.0 / 11
C3	-	8.55 / 11
C4	-	8.55 / <10
D1	6.3 / 10	-
D2	6.25 / <10	-
E1	-	3.75 / <10

Tabla 9. Spots que varían entre los estadios III y IV. Dado que algunos spots están fuera de los rangos predeterminados de los marcadores de peso molecular se identifican como menores al marcador de 10 kDa.

DISCUSION

En este estudio comparamos los perfiles bidimensionales de saliva de pacientes con RMS con un grupo de individuos control libres del RMS pareados por edad y género con el ánimo de evidenciar diferencias que puedan resultar de utilidad clínica. Proponiendo a la saliva, como el recurso biológico cuya diversidad proteínica, puede reflejar desviaciones del estado de salud tanto de la cavidad oral y por ende de las regiones adyacentes como cabeza y cuello. A esto se suman consideraciones prácticas como la abundancia biológica, su obtención por métodos no invasivos, y la frecuencia con la que puede ser obtenida.

Estandarización metodológica

Dado que existen numerosos reportes sobre los métodos de procesamiento y manipulación proteínica ^{1,5,58} y en ausencia de un protocolo consenso para procesar las muestras de proteínas provenientes de saliva, es necesario establecer un procedimiento metodológico que sea específico para el tipo de proteínas a analizar. En nuestro estudio, nos dimos a la tarea de estandarizar cada uno de los pasos previos a la generación de 2-DE con la intención de generar perfiles con la mayor diversidad proteínica posible, reproducibles y de alta resolución.

Colección de muestra

Logramos identificar diferencias sustanciales en los métodos de colección de muestra de saliva comparando un procedimiento con estimulación contra uno no estimulado. El volumen de saliva recolectado fue mayor con la técnica no estimulada y su patrón de bandeo electroforético unidimensional presentó un mayor número de bandas en un rango de 25 a 250 kDa (Fig.11), siendo estos resultados consistentes con su análisis de densidad.

Dado que el interés central de un estudio proteómico no sesgado es evaluar el universo más grande posible de proteínas presentes en una muestra, la literatura ^{21,59,60} hace alusión a que la saliva obtenida mediante un método no estimulado contiene proteínas de todas las glándulas salivales, por tanto, consideramos que la selección del método no estimulado resulta de mayor utilidad en estudios comparativos.

Si bien en este estudio no hemos asociado los cambios proteínicos observados con el origen glandular, esta asociación es posible.²¹ Esta consideración es importante porque toda vez identificadas las proteínas de utilidad clínica, estas podrían obtenerse con una mayor concentración inicial al ser colectadas directamente de la glándula salival que las produce.⁵⁹

El método no estimulado generó un mayor volumen de muestra que el estimulado durante un periodo de colección de 10 min (5 contra 4.2 ml) con concentraciones respectivas de 0.36 y 0.40 mg de proteína total /ml de saliva. Esto implica que el método no estimulado tiene un mayor rendimiento con 1.81 mg de proteína contra 1.68 del método con estimulación. En conclusión, el método no estimulado genera un mayor rendimiento proteínico y también posee una mayor representatividad de la secreción de todas las glándulas, por lo que se recomienda para este tipo de estudios.

Tinción

La técnica de tinción basada en el uso de colorantes fluorescentes ultrasensibles como “Deep purple” (Fig. 11 I y II) demostraron tener claras ventajas de mejor cobertura y mayor número de proteínas identificadas positivamente resultado de su alta sensibilidad comparada con la técnica que emplea azul de coomasie. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Ball y Karuso (2007)³². A nivel proteómico esta ventaja se explica en gran parte porque la tinción con Deep purple posee un amplio rango dinámico lineal, lo que es de gran valor para el análisis de distribución e identificación de proteínas y de sus modificaciones, especialmente cuando se cuenta con poca masa.

Debido a que en la tinción de plata se establece la unión de iones de plata a la estructura básica de las proteínas, seguido de precipitación de plata metálica, los resultados obtenidos son muy variables ya que este procedimiento es sensible a pequeñas variaciones de la temperatura y en los diferentes tiempos de incubación además de que posee un rango dinámico bajo. Aunque se han logrado avances en los protocolos, la compatibilidad espectral de masas sigue siendo un problema ya que si no se logra remover toda la plata se genera una gran interferencia durante la espectrometría de masa.

Procesamiento de la muestra

La limitación real durante la identificación de un spot correspondiente a una mancha proteínica en concreto, en general está determinada por la amplitud dinámica que presente la muestra a analizar, así como por la cantidad y calidad del extracto proteínico obtenido. A estas limitantes se suman la

concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos y otros contaminantes cuya abundancia depende directamente de la eficacia del método de extracción. De hecho, la preparación de la muestra es esencial y muchos trabajos recientes de proteómica se han centrado en la optimización de los protocolos de extracción y limpieza de las muestras en función del tejido u órgano en estudio.

Los procedimientos frecuentemente empleados previos a la solubilización de las proteínas que se resuelven en 2-DE, incluyen el uso de disolventes orgánicos como el TCA seguido de acetona fría para sus lavados.⁵⁸ Sin embargo, en nuestra experiencia las pastillas obtenidas precipitadas con TCA resultaron ser poco solubles en las etapas de rehidratación subsecuentes en comparación con los otros solventes orgánicos empleados.

Ante estos inconvenientes diversos autores han propuesto modificaciones a los protocolos antes descritos como colocar la pastilla previa a rehidratación en 10 ul de 0.2 M de NaOH por 2 min a temperatura ambiente seguido de 250 ul de buffer de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS).⁵⁵ Nosotros decidimos no emplear esta aproximación por la posible hidrólisis alcalina de las proteínas. Otros ^{56,58} sugieren dejar la solución de proteína precipitada 1 h a temperatura ambiente mezclando por vortex cada 10 min; posterior a este paso se centrifuga a 10,000 x rpm a 10° C con la intención de remover material insoluble.

A diferencia de lo reportado por Jessie K. ⁵⁸ en nuestro estudio, el método de precipitación para proteínas de saliva (método B) basado en el uso de acetona por 1 h fue el que obtuvo el mayor porcentaje de recuperación proteínica seguido de la mezcla de TCA/acetona/DTT por 1 h (método D) y pese a lo esperado, el menor porcentaje de recuperación fue obtenido con el producto comercial de recuperación "2-D clean up kit" de Amersham.

Los métodos B y D requirieron 3 veces más volumen de buffer de rehidratación para resuspender la pastilla; este resultado posiblemente tenga respuesta en el hecho de que la interacción generada con el interior hidrófobo de las proteínas es dependiente de concentración pero sobre todo del tiempo de hidratación, lo cual aumentaría la interacción y optimizaría el poder desnaturalizante.

Como puede verse en el ejemplo de los métodos A y B donde a pesar de emplear el mismo agente precipitante, el incremento de 1 a 24 h de precipitación marca una diferencia en el poder de recuperación de 23.02 %.

Pese a que los métodos C y E correspondieron a los de menor recuperación proteínica, en la evaluación de la diversidad existente en la muestra, los perfiles de distribución electroforética demostraron de manera evidente una mayor diversidad proteínica; en donde la diferencia de densidad óptica entre ambas técnicas presentó una mayor diversidad en el rango de 240 – 75 kDa. Esta zona generó la mejor distribución y abundancia de proteínas (Fig. 14a y 14b), lo que nos indica que estos métodos de precipitación actúan a favor de proteínas de alto peso.

La eficacia de los métodos C y E en geles de una sola dimensión se confirmó en 2-DE (Fig.17), en donde la resolución para ambos métodos fue semejante, sin embargo, el método E permitió la observación de spots en rangos de 37-25 kDa ausentes en el 2-DE correspondiente al método C. Más aún, el método E resultó en una mayor definición de los spots con una mejor reproducibilidad de los perfiles 2-DE.

Una de las grandes limitantes de los métodos de precipitación comercial como el estuche de reactivos “2-D Clean up kit” radica en que está limitado a un rango de concentración proteínica de 1 - 100 ug sin rebasar un volumen de 100 ul. Esto se debe muy probablemente a que por encima de este límite hay proteínas que ya no interaccionan eficientemente con los reactivos. Es interesante notar que esto no ocurrió con los otros métodos probados, ya que en estos, la proporción de volumen de reactivos vs muestra proteínica es escalable.

Como principal ventaja, el procedimiento de precipitación comercial se completa en 1h y no resulta en una pérdida o incremento de spots ni en cambios en la posición relativa de los mismos ya que está diseñado específicamente para la preparación de muestras para 2-DE.

Otras técnicas presentan desventajas significativas: i) 2-DE con poca abundancia de spots. ii) Baja resolución debido a la alta conductividad por excesos de sales, detergentes cargados o altos niveles de sustancias interferentes. iii) Precipitación incompleta, resultando en la pérdida de proteínas de la muestra e introducción de sesgo en los resultados de 2-DE. iv) Dificultad en la resuspensión v) Tiempos excesivos, requiriendo incubaciones de 12 hasta 24 h. vi) Generación de rayas, estrías y fondo inespecífico durante la tinción.

Concluimos, de manera similar a lo reportado por el grupo de Jessie (2008)⁵⁸, que la recuperación proteínica depende del precipitante empleado y que la separación de proteínas está

influenciada por el agente reductor, anfolitos y el buffer de rehidratación empleados.

Por tanto sugerimos emplear el estuche de reactivos “2-D Clean up kit” (método E) en el procesamiento de muestras de saliva, basados en los resultados de los criterios antes evaluados de diversidad, rendimiento y variabilidad, pero sobre todo reproducibilidad y definición.

METODOS DE ANALISIS FLUORESCENTES

2-D DIGE

La principal característica del método 2-D DIGE es la eliminación de todas las variables asociadas al gel, como deformaciones locales o la presencia de contaminantes. El protocolo asegura que todas las proteínas teñidas queden en la misma posición, y que como cada muestra está teñida con un fluorocromo diferente permite establecer diferencias cuantitativas tanto a la alta como a la baja. Esta aproximación es de gran utilidad en una exploración preliminar en estudios de casos y controles porque evidencia la existencia o no de diferencias con un valor significativo entre las muestras y un bajo CV%.

Una limitación de esta herramienta radica en que la señal decae con mayor velocidad comparada con la tinción de Deep purple. Sin embargo, la mayor limitación de este sistema radica en que el programa de análisis no provee las coordenadas de pI y M_r , ni tampoco provee de herramientas objetivas para distinguir spots de proteínas de artefactos.

Nuestro análisis con 2-D DIGE mostró la presencia de 1775 spots, esto es casi 3 veces por encima del número de spots identificados en otros estudios de saliva humana (Tabla 10). Este resultado tiene posiblemente su explicación en el hecho de que el marcaje de las muestras previo al 2-DE se realiza saturando el sistema por lo cual los límites basales de detección son menos astringentes pudiendo detectar spots artefacto. Por lo cual, la falta de validación y discriminación global entre spots de proteínas y artefacto no reflejan necesariamente la abundancia ni el perfil proteínico de nuestro resultado; sin embargo si permite establecer un panorama y aproximación del número de cambios probables entre las 2 muestras comparadas. Esto obliga a realizar una validación complementaria mediante análisis 2-DE convencionales como los base en Deep purple.

Tabla 10. Tabla comparativa de estudios 2-DE en saliva, donde se describe el tamaño de muestra empleado, el método de precipitación, la tinción y el número de spots identificados (R= rango, X= media) la columna de IEF hace alusión a la técnica de análisis proteínico, así como el tamaño de la tira para el isoelectroenfoque en un rango de distribución de pH .

Referencia	Objetivo	N=	Método	Precipitación	IEF	Tinción	Spots
Huang C. ⁶⁰	Análisis proteómico comparativo de la saliva total humana	4Hombres 4 Mujeres R(20-40) x(28.75)	Estimulado Escupir después de 3min cepillado s/pasta	10% TCA/DTT (1:1)	2-DE IPG 13cm pH3-10	Plata	202 spots saliva total MALDI-TOF 5 spots (26 proteínas)
Ghafouri B, <i>et al.</i> ³⁰	Mapa 2-DE de proteínas de saliva	5 adultos	Estimulado polyester-coated wool swabs (Salivette®, Sarstedt, Germany) 3 min	Desalada , columna (PD-10, Amersham Biosciences)	2-DE IPG 13cm pH 4–7 gel gradiente	SYPRO Ruby	~ 600 spots 101 MALDI-To
Vitorino R, <i>et al.</i> ⁶¹	Identificación de componente proteínico en saliva total	1 H (25 años)	No estimulado 1ml	No precipitación	2-DE IPG 13cm pH 3–10	Plata, coomassie coloidal	200 spots 43 spots MALDI-TOF

Hardt, <i>et al.</i> ⁶²	Proteoma saliva de glándula parótida	2 H (30,24 años) 1 M (22)	Lashley cup conducto parotídeo	Desalada ultrafiltración Acetona - 20°	2-DE IPG13 cm pH 3-10	Cooma sie R250	27 spots MALDI TOF
Quintana M, <i>et al.</i> ⁶³	Variabilidad interindividual de patrones 2-DE saliva total adulto	6 H 6 M, 2 tomas 10am , 3pm mismo día	No estimulada Escupen 2 min	Columna Cut-off	2-DE IPG 17 cm pH 3-10NL	Azul plata	509 spots MALDI-TOF
Rao P, <i>et al.</i> ⁶⁴	Proteoma saliva pacientes Dt2	10 Dt2 10 intolerantes 10 ctrls	No estimulada 5 min	Membrana Ultrafree 5k	2D-LC-MS/MS	_____	487 proteínas

Deep purple

Como ya hemos definido anteriormente, el objetivo de las imágenes de 2-DE es mostrar proteomas claros para la vista humana y compatibles con los programas de análisis que posteriormente puedan facilitar la comparación de muestras de diferentes condiciones salud y enfermedad y ayudar en la localización de proteínas. Rabilloud 2002⁶⁵ estima que, dependiendo del procedimiento de tinción, los análisis de 2-DE permiten la visualización al mismo tiempo de cientos de proteínas (>600 spots por gel) (Tabla 10).

Sin embargo, una de las dificultades técnicas del análisis 2-DE es la validación interna de cada spot para su inclusión en un posterior análisis global del proteoma (gel maestro), por ello definimos con un abordaje tridimensional las características que requería cada spot para diferenciarse de una mancha artefactual producto de contaminación durante el procesamiento o la tinción con Deep purple (Fig.19):

i) Intensidad: establecida mediante el promedio de las intensidades de pixeles en el spot del cual se ha retirado el fondo, definido como el valor de pixel mínimo en la zona de localización.

ii) Área o superficie: la cual mediante el programa Image Master calcula el área en 75% de la intensidad de la mancha medida desde la zona de mayor intensidad dentro del spot y expresada en mm².

iii) Volumen: calculado como el volumen por encima del contorno del spot, que está situado a 75% de la altura total del spot, medido desde la mayor intensidad de la mancha.

Por lo tanto, el volumen de una proteína en un gel es proporcional a la oscuridad de la mancha correspondiente en la imagen escaneada del gel y mediante la comparación de las intensidades de los spots en la imagen del gel escaneado, los volúmenes de los spots del 2-DE pudieron ser comparados con sus controles y permitió la identificación de cambios categóricos, es decir, si un spot se encuentra o no presente en una muestra.

Mediante el método de frecuencias de spot (aparición de un spot en, al menos 3 de cada 5 geles de la misma muestra) logramos construir un modelo in silico del gel maestro para cada condición (caso y control) con los puntos validados previamente en cada gel, lo cual nos permitió comparar el proteoma de nuestros casos (RMS) contra el proteoma de nuestros controles con un coeficiente de variación (CV%) bajo (Fig. 18, 22).

Este razonamiento de validación y la generación de un *pool* para el análisis de geles maestros, al igual que en nuestro estudio ha sido empleado por diversos autores como Friedman *et al* ⁶⁶. para el análisis 2-DE de identificación de cambios tumor-específicos en el proteoma de cáncer colorectal. Knowels *et al.* ⁶⁷ y Swatton *et al.* ⁶⁸ en la identificación de cambios en el proteoma de corteza cerebral, y Tonge *et al.* ⁶⁹ quien evalúa la toxicidad de paracetamol en hígado mediante 2-DE.

Comparaciones entre geles maestros teñidos con Deep purple

En este trabajo se realizaron 4 geles maestros: i) Total de pacientes con RMS incluidos en el estudio n=12 ii) Controles n=13 iii) Pacientes con RMS en estadio III n= 6 iv) Pacientes con RMS en estadio IV n=7.

Mientras que los primeros dos geles maestros se realizaron por quintuplicado, los últimos dos solo se hicieron una sola vez, es por este motivo que la comparación entre estadios carece de significancia estadística y representa solo un resultado preliminar (Fig. 24).

MALDI-ToF/MS

La identidad de las proteínas pertenecientes a los 3 spots con expresión diferencial para el RMS, (Tabla 8) resultó asociada a diversos procesos patológicos, de los cuales la literatura describe lo siguiente:

Mucina 7, se expresa en las células epiteliales de la cavidad oral, glándulas salivales menores, vías respiratorias y conjuntiva. Funciona como un agente antimicrobiano en la cavidad oral mediante la interacción con los microorganismos. Aglutina el virus del sida VIH-1 e inhibe la infección por el VIH debido principalmente a los dos residuos de cisteína localizados en la región N-terminal de MUC7. Por otra parte, actúa con actividad anti-cándida a través de su dominio de histidina. Se expresa en el cáncer de vejiga durante la transformación maligna de epitelio vesical en el carcinoma in situ pre-invasiva. Su expresión aberrante está bien documentada en una variedad de enfermedades inflamatorias y malignas. Desde un punto de vista pronóstico, sus alteraciones en la expresión de glicosilaciones están asociadas con el desarrollo y progresión de enfermedades malignas.⁷⁴

Desmogleina-3, es una proteína desmosómica de la familia de caderinas; diversos estudios como el de Czerwenka K. y cols.⁷⁶ (2001) Comparan los patrones proteínicos 2-DE de tejido de cáncer de mama de muestras congeladas contra tejido normal. De los 34 geles que procesan, tan solo emplean 4 tumorales y 4 sanos debido a la calidad de los geles generados para su análisis; además de las proteínas que identifican como Receptor del factor de crecimiento (GFRs), incluidas ERBB2 (HER2) y ERBB3 (HER3), identifican un elevado incremento en la expresión de desmogleina-3 expresadas solo en las muestras tumorales malignas.

Con la misma intención, Fukuoka en el 2007 evalúa la expresión de desmogleina-3 en carcinoma de células escamosas de pulmón, en donde observan un elevado incremento en su expresión sobre esta entidad respecto al adenocarcinoma de pulmón y pulmón normal, proponiendo con ello su asociación como marcador pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón, asociando su alta expresión con un comportamiento más agresivo que en tumores atípicos.

De forma más reciente, en el 2011 Porowska G, y cols.⁷⁸ Miden la expresión de las isoformas de Desmogleina-2 y 3 en carcinoma de células basales (CCB) comparándola con epidermis sin afección del CCB; reportan una sobreexpresión significativa de desmogleina-2 y una disminución en la expresión de

desmogleina-3 en CCB. Ellos sugieren que en piel humana, la desmogleina-2 parece mediar la adhesión al estar más asociada a proliferación, mientras que la desmogleina-3 media la adhesión aparentemente en asociación con más diferenciación.

Patel V, et al. ⁷⁹ en un análisis proteómico de masas para conocer el patrón molecular de la progresión de cáncer de cabeza y cuello encuentran la sobreexpresión de Desmogleina-3 en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Trombospondina-1 (TSP1) ⁸⁰, es una glicoproteína de la matriz extracelular que influencia la adhesión, motilidad y crecimiento, se ha confirmado que el incremento de su expresión suprime el crecimiento tumoral y metástasis de algunos tumores in vivo así como la inhibición de angiogénesis. Sin embargo, esta sobreexpresión de TSP1 en algunos tumores causan un incremento en la progresión tumoral.

Tamaño muestral

Pese a que a la fecha no existen en la literatura reportes alusivos a estudios 2-DE de saliva en RMS, la estimación del tamaño de la muestra no fue posible; sin embargo con los resultados obtenidos de nuestro estudio proponemos el siguiente ejercicio de cálculo muestral:

Tamaño estimado para una muestra en comparación con el valor hipotético (para 2 proporciones dependientes) Calculado con programa STATA 11.1

Prueba Ho: $p = 0.0096$, donde p es la proporción en la población

Supuestos:

$$\alpha = 0.0500 \text{ (dos colas)}$$

$$\text{poder} = 0.9000$$

$$p \text{ alternativa} = 0.1700$$

$$\alpha = 0.0500 \text{ (dos colas)}$$

$$\text{poder} = 0.8000$$

$$p \text{ alternativa} = 0.1700$$

Tamaño de muestra estimada requerida:

$$n = 18 \text{ para cada grupo}$$

Tamaño de muestra estimada requerida:

$$n = 11 \text{ para cada grupo}$$

Donde el valor de H_0 es tomado del estudio y el valor de p alternativa es tomado del % de variación obtenido del ensayo con 2-D DIGE (16.2% disminuyen expresión + 0.8% incrementan expresión RMS vs controles).

Por lo tanto, con base a este cálculo, con un poder de 0.9 son necesarios 18 casos de RMS y 18 controles pareados.

Para el cálculo con un poder de 0.8 son necesarios 11 casos de RMS y 11 casos de controles pareados.

CONCLUSIONES

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en muchas partes del mundo, el desarrollo de métodos eficientes de diagnóstico representa uno de los enfoques más prometedores para reducir el constante incremento de casos aquejados en estadios avanzados. Pese a que existen protocolos de diagnóstico clínico, el desarrollo de pruebas moleculares de detección seguras, eficaces y no invasivas sigue siendo de urgente necesidad.

La proteómica está abriendo nuevas vías para el descubrimiento en los líquidos biológicos de biomarcadores proteínicos o peptídicos de enfermedad que puedan emplearse para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de las enfermedades. La combinación de varios biomarcadores proteínicos o peptídicos en un patrón específico “huella molecular”, probablemente definirá con mayor precisión una determinada enfermedad, o una situación clínica específica.

En el caso particular, los biomarcadores proteínicos de asociación a enfermedad en saliva han resultado altamente prometedores y son útiles hoy día en la identificación de enfermedades proximales a la boca como infecciones periodontales, úlceras gástricas, hepatitis (B y C) y carcinoma oral de células escamosas así como, en la detección de enfermedades sistémicas no proximales como función ovárica, adenocarcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma y diagnóstico de VIH, entre otros.

Como se ha descrito, las técnicas de alta resolución como 2-DE seguidas de DIGE o masas permiten hacer un *screening* completo, y lograr con ello la evaluación y análisis de variaciones individuales o colectivas dentro del proteoma, estas tecnologías actualmente permiten visualizar hasta 1000 proteínas diferentes en un momento particular, resultado de procesos de adaptación celular, cambio de estado físico-patológico, ajustes en vías metabólicas, aumento o disminución del tráfico vesicular, etc.. lo que favorece un rearrreglo del universo proteínico.

Los patrones proteínicos generados en 2-DE permiten visualizar algunos de estos cambios, sin embargo, su identificación es dependiente de que los cambios se presenten en una región del gel con pocas proteínas y que los cambios en abundancia relativa sean grandes. Por ello, el abordaje 2-DE favorece la búsqueda sin prejuicios de cambios. Sin embargo, un paso determinante en el procesamiento de la información consiste en definir cuales spots o manchas, corresponden a proteínas y cuales son artefactos. En nuestra consideración, esta etapa determina el tipo de resultados que se

obtienen, ya que define el universo de señales (spots) que se identificarán como proteínas, que en etapas posteriores se podrán asociar y eventualmente definirán un estadio patológico.

Basándonos en nuestros resultados, cuya primera etapa consistió en generar las condiciones estandarizadas para la subsecuente obtención de 2-DE, logramos la identificación de cambios en los perfiles de expresión de proteínas salivales, sugiriendo la asociación de estas proteínas y el rearrreglo bidimensional como resultado de las modificaciones o adaptaciones moleculares generadas por el Rabdomiosarcoma. Sin embargo su confirmación y asociación es necesaria.

Estudios como estos, deberán abrir nuevas puertas a la utilización del proteoma salival como la base para la obtención de pruebas no invasivas de detección y control de enfermedades. Por ello, el objetivo principal de la era post-genómica seguirá siendo el descubrir, que, cuándo, dónde y cuántos de los cambios expresados a nivel de proteínas puedan identificarse en fluidos corporales como la saliva.

REFERENCIAS

- 1 Zimmermann B, Wong D. Salivary mRNA targets for cancer diagnostics. *Oral Oncology*. 2008; 44, 425-429.
- 2 Mas Oliva Jaime. "Diagnóstico molecular en medicina". 2ª ed. México, Manual moderno, 2007.
- 3 Vasan R. Biomarkers of Cardiovascular Disease Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation* 2006; 113: 2335-2362.
- 4 Pavlou M, Diamandis E. The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers?. *Journal of Proteomics* 2010; 73: 1896–1906.
- 5 Yang M, Rajan S, et. al. Cost effectiveness of gene expression profiling for early stage breast cancer: A decision-analytic model. *Cancer*. 2012; 2(22): 1-8.
- 6 Cuadros M, Llanos A. Validation and clinical application of MammaPrint® in patients with breast cancer. *Medicina Clínica*. 2011; 5; 136(14): 627-32.
- 7 Thongboonkerd Visith. "Proteomics of Human Body Fluids, Principles, Methods, and Applications". New Jersey, Edit Humana Press, 2007. pp. 152-154.
- 8 Atkinson A, Colburn W, et al. NCI-FDA Biomarkers Definitions Working Group; Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001; 69: 89–95.
- 9 Bangma C, Grobbee D, et al. Volume adjustment for intermediate prostate-specific antigen values in a screening population. *European Journal of Cancer*. 1995; 31A(1): 12–14.
- 10 Lewis S, Menon U. Screening for ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2003;3:55-62.
- 11 Choo R, Huestis M. Oral fluids as a diagnostic tool. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2004; 42(11):1273-87.

- 12 Lawrence H. Salivary markers of systemic disease: non invasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *Journal of the Canadian Dental Association* 2002; 68(3): 170-4.
- 13 Schipper R, Silletti E. et al. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*. 2007; 52: 1114–1135.
- 14 Wong David. "Salivary Diagnostics". Iowa USA. Wiley-Blackwell. 2008.
- 15 Amado F, Vitorino R, et al. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Review of Proteomics* 2005; 2(4), 521–539.
- 16 Bolscher J, Nazmi K, et al. Inhibition of HIV-1 IIB and clinical isolates by human parotid, submandibular, sublingual and palatine saliva. *European Journal of Oral Sciences* 2002; 110:149-56.
- 17 Neyraud E, Sayd T. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes *Journal of Proteome Reserch* 2006; 5: 2474-2480.
- 18 Schiboski C, Hodgson T. Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2007 (103 Suppl); S66:e61-19.
- 19 Sabarni K, Chatterjee R. Cancer biomarkers: knowing the present and prediction the future. *Future Oncology*. 2005; 1(1):37-50.
- 20 Shen H, Jianghua W, Jiska M. Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56 (11): 3588-3600.
- 21 Denny P, Hagen F, et al. The proteomics of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research*. 2008; 7 :1994-2006.
- 22 Hu S, Arellano M, Boontheung P. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(19) :6246-6252.
- 23 www.saliva.bme.ucla.edu
- 24 Wilkins M, Sánchez J, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 1996; 13: 19-50.

- 25 Földi I, Müller G. Characterisation of the variation of mouse brain proteome by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*. 2011; 74(6): 894-901.
- 26 Khan M, Bennett M. Proteomics by mass spectrometry- go big or go home? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; 55(4): 832-41.
- 27 González B, Ferreira L. Clinical proteomics and new biomarkers in biological fluids. *Medicina Clínica* 2008; 131(11): 426-34.
- 28 Lahm H, Langen H. Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis*. 2000;(21)11: 2105 – 2114.
- 29 Thomas M. Devlin. "Textbook of Biochemistry with clinical correlations". USA, Wiley-Liss 6th edition. 2006, pag. 120.
- 30 Ghafouri B, Tagesson C. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2003; 3:1003-1015.
- 31 Castle A, Castle D. Enhanced Glycosylation and Sulfation of Secretory Proteoglycans Is Coupled to the Expression of a Basic Secretory Protein. *Molecular Biology of the Cell* 1998 March; 9(3): 575–583.
- 32 Ball M, Karuso P. Mass Spectral Compatibility of four proteomics stains. *Journal of Proteome Research* 2007; 6(11): 4313-20.
- 33 Sanchez J, Appel R, et al. Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* 1995; 20: 1131-1151.
- 34 Celis, J, Gromov P, et al. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *FEBS Lett*. 1996; 398(2-3):129-134.
- 35 Ghafouri B, Stahlbom B. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2002; 2(1): 112-120.
- 36 Sabounchi S, Arstrom J. Detection and identification of human bronchoalveolar. *Electrophoresis*. 2001; 22(9):1851-1860.
- 37 Amerongen A, Veerman V. Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Disease*. 2002; 8(1): 12-22.

- 38 Keller P, Kauffman D, et al. Further studies on the structural differences between the isoenzymes of human parotid-amylase. *Biochemistry*. 1971; 10:4867-74.
- 39 Oppenheim F, Hay D, Franzblau C. Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. isolation and partial characterization. *Biochemistry*. 1971; 10: 4233-38.
- 40 Schlesinger D, Hay D. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *Journal of Biological Chemistry* 1976; 252:1689-95.
- 41 Oppenheim F, Xu T, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:7472-7.
- 42 Rahemtulla M, Rahemtulla F, et al. Human salivary peroxidase and bovine lactoperoxidase are cross-reactive. *Journal of Dental Research* 1990; 69:1839-46.
- 43 Barnes L, Eveson J. et al. "Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors" World Health Organization Classification of Tumors. Lyon, France. 2005 pp. 35-38, 60-69, 335.
- 44 López M, Barañón I. Inmunohistoquímica en el diagnóstico de rhabdomyosarcoma alveolar. *Anales Médicos de la Asociación Médica Hospitalaria. ABC*. 2004; 49 (3): 151-155.
- 45 González E, Martín J, Noyola M. Rhabdomyosarcomas en la región cervicofacial: Informe de dos casos. *Asociación Dental Mexicana* 2000;LVII(4):154-158.
- 46 Lazos O, Ávila A. Sarcomas de cabeza y cuello. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.* 1999; 62 (3): 176-182.
- 47 Stevens M. Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure. *The Lancet Oncology* 2005; 6(2): 77-84.
- 48 Raney R, Anderson J, et al. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2001 May;23(4):215-20.

- 49 Parham D. Pathologic Classification of Rhabdomyosarcomas and Correlations with Molecular Studies *Modern Pathology*. 2001;14(5): 506–514.
- 50 Hicks J, Flaitz C. Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children. *Oral Oncology*. 2002; 38: 450–459.
- 51 Simon J, Paulino A. Prognostic factors in head and neck rhabdomyosarcoma. *Head Neck* 2002;24:468-73.
- 52 Mosqueda Taylor A. “Tópicos Selectos de Oncología Bucal” (Clínicas Oncológicas de Iberoamérica). México. Ed. DESA; 2007 p.162.
- 53 Tabak L. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *Journal of Dental Education* 2001;65:1335-9.
- 54 Lawrence W, Anderson J, et al. Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1997, 15;80(6):1165-70.
- 55 Görg A, Weiss W, et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4: 3665–3685.
- 56 Jiang L. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *The Journal of Chromatography A* 2004,1023: 317-320.
- 57 Changjiang Xu, Bin Ma. *Drug Discovery Today*. 2006, 11(13/14).
- 58 Jessie K, Hashim O, et al. Protein Precipitation Method for Salivary Proteins and Rehydration Buffer for Two-Dimensional Electrophoresis. *Biotechnology*. 2008, 7(4): 686-693.
- 59 Percival R, Challacombe S, et al. Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Salivain Relation to Age and Gender. *Journal of Dental Research* 1994, 73(8): 1416-1420.
- 60 Huang Chun. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*. 2004, 49: 951—962.
- 61 Vitoriono R, Lobo M, et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004, 4: 1109–1115.

- 62 Hardt M, Thomas L, et al. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* 2005, 44; 2885-2899.
- 63 Quintana M, Palicki O, et al. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults.. *Journal of Proteomics*. 2009, 72: 822–830.
- 64 Rao P, Reddy A, et al. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *Journal of Proteome Research* 2009, 8: 239–245.
- 65 Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002, 2: 3–10.
- 66 Friedman D, Hill S, et al. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2004 4(3):793-811.
- 67 Knowles M, Cervino S, et al. Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003, 3(7):1162-71.
- 68 Swatton J, Prabakaran S, et al. Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Molecular Psychiatry* 2004, 9(2):128-43.
- 69 Tonge R, Shaw J, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*. 2001 Mar;1(3):377-96.
- 70 Bergey E, Cho M, et al. Aggregation of human immunodeficiency virus type 1 by human salivary secretions. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;4:467–474.
- 71 Bergey E, Cho M, et al. Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1994;7:995–1002.
- 72 Nagashunmugam T, Malamud D, et al. Human submandibular saliva inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection by displacing envelope glycoprotein gp120 from the virus. *The Journal of Infectious Diseases* 1998;178:1635–1641.
- 73 Liu B, Rayment S, et al. Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999;364:286–293.

- ⁷⁴ Liu B, Rayment S, et al. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochemical Journal* 2000;345:557–564.
- ⁷⁵ Satyanarayana R, Torres M. Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer. *Biofactors*. 2009 ; 35(6): 509–527.
- ⁷⁶ Czerwenka K, Manavi M, et al. Comparative analysis of two-dimensional protein patterns in malignant and normal human breast tissue. *Cancer Detection and Prevention Cancer* 2001;25(3):268-79.
- ⁷⁷ Fukuoka J, Dracheva T, et al. Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Human Pathology*. 2007, 38(2): 276–283.
- ⁷⁸ Porowska G, Dmochowska B, et al. Loss of correlation between intensities of desmoglein 2 and desmoglein 3 expression in basal cell carcinomas. *Acta Dermatovenerologica Croatica* 2011 Sep;19(3):150-5.
- ⁷⁹ Patel V, Hood B, et al. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clinical Cancer Research* 2008 Feb 15;14(4):1002-14.
- ⁸⁰ Roberts D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J*. 1996 Aug;10(10):1183-91.