



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PROTEICOS EN SUERO DE  
PACIENTES CON INFLUENZA A H1N1(PDM09)”**

**T E S I S**

**Para obtener el título de Biólogo**

**P R E S E N T A:**

**Diana Raquel Ortiz Soriano**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda**

**LOS REYES IZTACALA, 2015**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

**VOCAL:** Dr. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

**SECRETARIO:** Dr. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

**1er. SUPLENTE:** Dra. DIANA IVETTE APARICIO BAUTISTA

**2º SUPLENTE:** M. en C. ALEJANDRO MONSALVO REYES

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Instituto Nacional de Medicina Genómica**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Diana Raquel Ortiz Soriano**

\_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

**Dedico esta tesis a mis amigos quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo en que escribía esta tesis.**

**A mis padres quienes me apoyaron todo el tiempo.**

**A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar que muchas veces no ponía atención en clase, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.**

**A los sinodales quienes revisaron mi tesis y la aprobaron.**

**A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis y a mis sinodales quienes revisaron oportunamente este trabajo.**

**A mi padre Miguel Ortiz, a mi madre Raquel, quienes me apoyaron económicamente durante toda la carrera. A mi hermano Alex por su apoyo incondicional y porque siempre me hizo reír en la casa a pesar de todo.**

**A mis amigos de la FES, en especial a Lalo quien siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas, por todo su apoyo incondicional y por las tardes y decisiones que tomábamos con las Freskas, por sus momentos de discreción en los laboratorios, y por apoyarme hasta el último momento a continuar y reunirme con mis locuras.**

**A mis amigos del laboratorio: Germán, María Paulette y en especial a Richard que siempre me apoyó y me tuvo paciencia para enseñarme, ayudarme en el laboratorio, por creer en mi y por su cariño. Mil gracias Rich.**

**¡A todos los quiero mucho!**

## I) Resumen

---

Las enfermedades respiratorias son causadas por distintos patógenos, entre los que se encuentran los virus y entre ellos, el virus de Influenza tipo A subtipo H1N1, causante de la pandemia del año 2009, este virus presenta un genoma de ARN de cadena sencilla de sentido negativo, lo que lo hace tener una alta tasa de mutación, aunado a la posibilidad de infectar distintos hospederos como cerdos, aves y humanos lo hace de suma importancia para el hombre. Actualmente a pesar de las dosis de vacuna disponibles, la OMS estima que cada año se presentan alrededor de mil millones de casos de influenza estacional, de los cuales 300 a 500 mil terminan en defunciones. La infección por el virus, causa un cuadro clínico con dolor de garganta, tos, fiebre, exceso de mucosidad nasal, dolor de cabeza y malestar general; para confirmar una infección por este virus son necesarios ensayos que confirmen la presencia de este virus mediante PCR o ensayos inmunológicos. Ya que el virus presenta resistencia contra los antivirales recetados comúnmente, para las infecciones con el virus A H1N1, se recetan antivirales tales como oselamivir y zanamivir. La proteómica se ha apoyado en diversas técnicas como geles bidimensionales y espectrometría de masas para la identificación de proteínas en la búsqueda de posibles biomarcadores para diagnóstico o como futuros blancos terapéuticos para diseño de nuevos fármacos o vacunas contra infecciones virales. En el presente estudio se busca identificar proteínas diferencialmente expresadas en suero de pacientes con Influenza A H1N1(pdm09), confirmados mediante PCR, en comparación contra controles, mediante la realización de geles de electroforesis diferencial (DIGE) y espectrometría de masas para la identificación de proteínas. A partir de los geles diferenciales se eligieron 10 *spots*, los cuales presentaron un aumento en su expresión de dos o más veces con respecto a los controles. Estos *spots* fueron cortados y procesados para ser identificados mediante espectrometría de masas utilizando el equipo MALDI TOF/TOF mediante el software ProteinPilot™ (AB Sciex), de los diez *spots* se identificaron un total de seis proteínas humanas sobreexpresadas en casos clínicos, las cuales sugieren que pueden interactuar en la respuesta inmune del hospedero contra el virus. Entre las proteínas que se encontraron sobreexpresadas en los pacientes, se reporta la presencia de la proteína ZC3HAV1, que pertenece al dominio de las proteínas de dedos de zinc, ZC3HAV1 es una proteína antiviral con capacidad de reconocer y capturar el ARN viral para reclutar maquinaria necesaria y comenzar con la degradación del mensajero; este dominio de proteínas ha demostrado tener acción inhibitoria contra distintas familias de virus de ARN, tales como *Retroviridae*, *Fliviridae* y *Togaviridae*. Por lo que se sugiere que en este tipo de infección pueda estar actuando de manera similar y por lo tanto se propone continuar con estudios fisicoquímicos que la caractericen y posteriormente análisis funcionales.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Manifestaciones clínicas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Tratamiento y Prevención</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Estructura del Virus Influenza A H1N1(pdm09)</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3.1 Proteínas virales</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3.2 Ciclo replicativo</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Respuesta Inmune</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 Panorama actual de Influenza en México</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6 Proteoma</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6.1 Biomarcadores proteicos</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6.2 Estrategias proteómicas</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6.3 Tecnologías proteómicas</b> .....	<b>14</b>
<b>1.7 Estudios proteómicos en Influenza A H1N1</b> .....	<b>17</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Objetivo General .....	19
4.2 Objetivos Particulares .....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 Obtención de las muestras .....	21
5.2 Cuantificación de proteínas e integridad de las muestras .....	21
5.3 Enriquecimiento de las proteínas minoritarias de las muestras .....	24
5.4 Geles de electroforesis diferencial. <i>Difference Gel Electrophoresis (DIGE)</i> .....	26
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>

6.1 Enriquecimiento de muestras por cromatografía líquida de alta eficacia. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). .....	38
6.2 Geles de electroforesis diferencial. <i>Difference Gel Electrophoresis</i> (DIGE). 40	
6.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	49
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA), son ocasionadas principalmente por patógenos como virus o bacterias y en ocasiones ambos, los cuales provocan una infección en las vías respiratorias que pueden complicarse para dar pie a neumonías y bronconeumonías (Secretaría de Salud, 2014).

Los virus son uno de los grupos de patógenos con gran importancia para el hombre, entre los cuales destaca el virus de Influenza tipo A; un miembro de este tipo de Influenza fue el causante de la pandemia de gripe en el año 2009 y el cual se caracterizó como virus de Influenza A H1N1(pdm09), que rápidamente se dispersó en países de distintas áreas geográficas, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), le asignó el nivel seis de las fases de pandemia (Dawood *et al.*, 2009).

Sin embargo, la pandemia progresivamente se convirtió en un patrón estacional para el año 2010. Se ha observado que en climas templados, las epidemias estacionales se presentan en la época invernal, mientras que en las regiones tropicales puede presentarse durante todo el año con brotes más irregulares (Longo *et al.*, 2012). Actualmente a pesar de las dosis de vacuna disponibles en temporada invernal, la OMS estima que cada año se presentan alrededor de 1,000 millones de casos de influenza estacional, de los cuales entre tres y cinco millones de casos son severos y 300 a 500 mil terminan en defunciones. (Secretaría de Salud, 2014).

### 1.1 Manifestaciones clínicas

Los virus de Influenza, pueden permanecer latentes por varias horas en objetos o superficies contaminadas con pequeñas gotas de saliva o secreciones nasales, los cuales al entrar en contacto con ojos, boca o nariz, ingresan a nuestro organismo e infectan a las células epiteliales de la parte superior de las vías respiratorias, lo que ocasiona la inflamación de las mismas y el desarrollo del cuadro clínico de la infección. Asimismo, en algunas ocasiones cuando la infección

se complica, puede afectar también a la porción inferior del aparato respiratorio (Longo *et al.*, 2012 y Koulder *et al.*, 2011).

Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por dolor de garganta, tos, fiebre, exceso de mucosidad nasal, dolor de cabeza y malestar general; los cuales no pueden distinguirse de los causados por una infección respiratoria común, por tal motivo, para la confirmación de infección por el subtipo de virus Influenza A H1N1(pdm09), se realizan distintas pruebas diagnósticas, que pueden ser de antígenos con ensayos de inmunofluorescencia, inhibición de hemaglutinación tipo H1 o ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa o RT-PCR por sus siglas en inglés (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) (Dawood *et al.*, 2009).

## **1.2 Tratamiento y Prevención**

Existen dos clases de antivirales que son recetados contra la infección por virus de Influenza. Los primeros son los fármacos amantadina y rimantadina, inhibidores de canales iónicos transmembranales para la Proteína M2 (proteína de membrana), que provocan que la membrana del virus no pueda fusionarse con la membrana del endosoma y por tanto el virus no puede liberar su material genético y replicarse. Sin embargo, el subtipo de virus de Influenza A H1N1(pdm09), muestra resistencia hacia estos antivirales. Los segundos antivirales, comprenden a los fármacos osealtamivir, zanamivir y más recientemente peramivir y maninamivir, inhibidores de Neuroaminidasa (NA), debido a que el fármaco se adhiere a la NA del virus e inhibe su actividad, evita que los virus se liberen y propaguen desde las células infectadas a células sanas. La OMS recomienda el uso de estos antivirales para los individuos que necesiten un tratamiento con terapia antiviral (Centers for Disease Control and Prevention, 2015 y World Health Organization, 2012).

Con respecto a la vacunación, existen dos tipos de vacunas, independientemente del tipo de cepas que contengan, el primero comprende a las vacunas de virus inactivos que puede ser de dos tipos: la que contiene al virus completo, que es más inmunogénica y reactogénica, y la que contiene al virus fraccionado, que presenta buena inmunogenicidad pero es menos reactogénica; para ambas

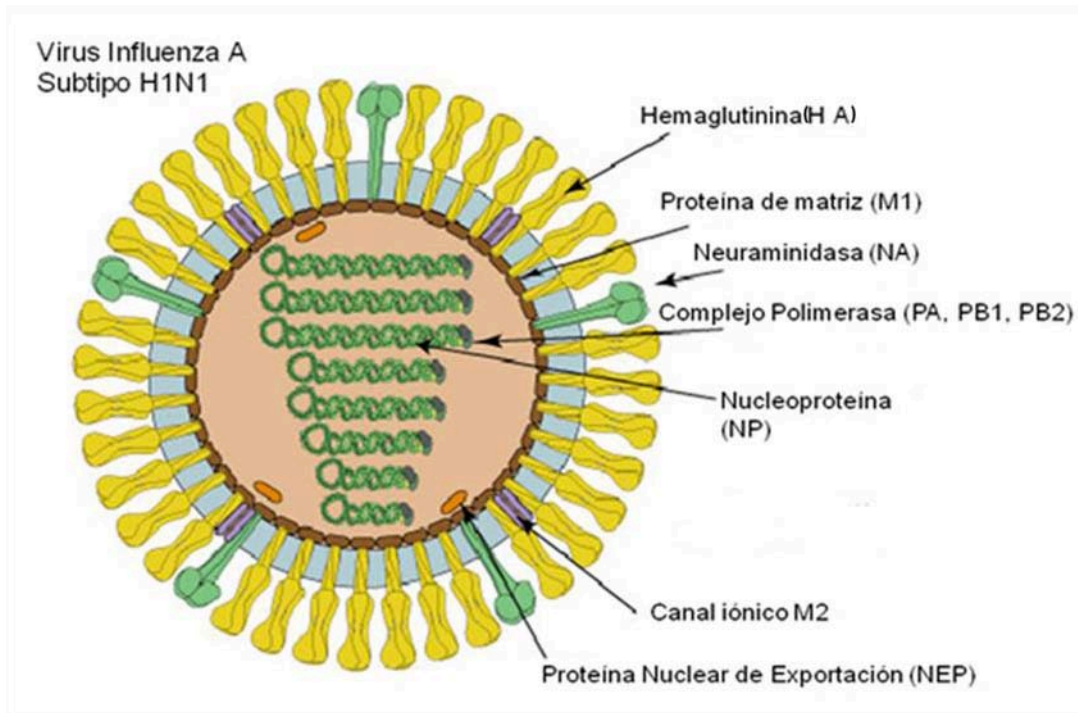
vacunas su vía de administración es intramuscular. El segundo tipo de vacuna, es la que contiene virus atenuados y su vía de administración es oral o intranasal, pero esta solo se encuentra disponible en E.U.A. (World Health Organization, 2012).

En la actualidad, en México la vacuna contra la influenza se aplica vía intramuscular y es necesario aplicarla anualmente, ya que la composición de esta vacuna varía año con año, debido a los cambios antigénicos del virus. Para esto, son utilizadas las vacunas trivalentes de virus inactivos fraccionados, es decir, vacunas elaboradas con partículas de virus que contienen dos cepas de Influenza A H1N1 y H3N2 y una cepa de Influenza B (Secretaría de Salud – CeNSIA, 2015). Es importante mencionar que las vacunas son revisadas dos veces al año, ajustando las características antigénicas de las cepa en circulación, obtenidos por la Vigilancia de la Influenza Global y Sistema de Respuesta o GISRS, por sus siglas en inglés (*Global Influenza Surveillance and Response System*) (World Health Organization, 2012).

### **1.3 Estructura del Virus Influenza A H1N1(pdm09)**

Los virus de Influenza, son partículas esféricas irregulares de 80-120nm de diámetro, poseen una envoltura derivada de la membrana plasmática proveniente de las células hospederas, donde se expresan las glicoproteínas Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (Figura1), las cuales están involucradas en el reconocimiento del virus y en la liberación de las nuevas partículas virales, respectivamente. Dentro de la membrana, se encuentra la nucleocápside con un diámetro de 9 a 15nm, la cual contiene al genoma viral (Longo *et al.*, 2012).

El virus de Influenza A H1N1(pdm09), pertenece a la familia *Orthomixoviridae* del tipo A, subtipo H1N1. Existen tres diferentes tipos de Influenza, según las características antigénicas de su nucleoproteína (NP) y los antígenos proteicos de la matriz (M), nombrados A, B y C. Cada tipo de Influenza, a su vez se divide en subtipos, el cual es asignado por las diferencias de antígenos entre las proteínas HA y NA. Cabe mencionar que hasta hoy en día se han descrito 17 diferentes subtipos de HA y 10 subtipos de NA (World Health Organization, 2012).



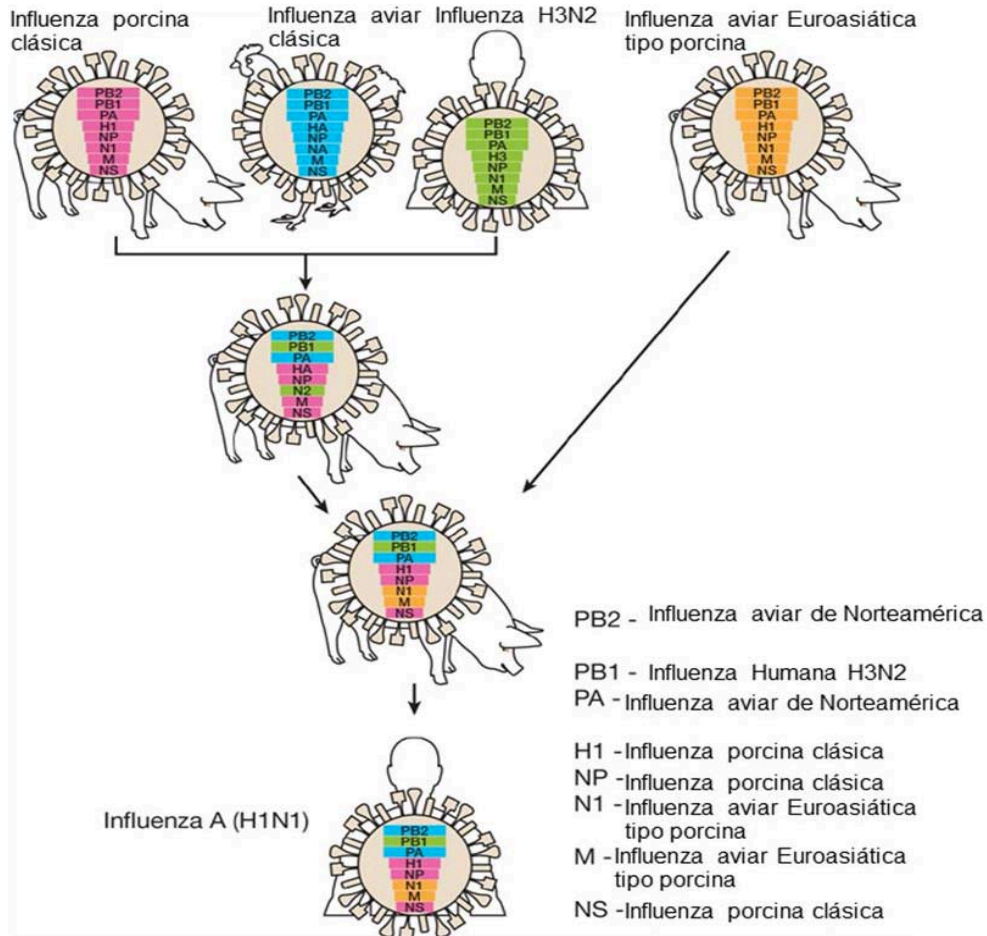
**Figura 1.** Estructura del virus de Influenza A H1N1. Virus de 80-120nm de diámetro, con envoltura donde se encuentran embebidas las proteínas NA y HA, utilizadas para el reconocimiento y liberación de la partícula viral. Dentro de la cápside se encuentran su material genético que consta de 8 segmentos de ARN de cadena simple de sentido negativo y la proteína nuclear de exportación. (Modificada de <http://viralzone.expasy.org/> Fecha de consulta: noviembre 2014).

Con respecto su genoma, los virus de Influenza tipo A, presentan dentro de una nucleocápside su información genética en forma de ARN monocatenario de sentido negativo, el cual está segmentado en ocho fragmentos o genes. Estas características le permiten al virus presentar y acumular variaciones genéticas al momento de la replicación viral, aunado a esto, la amplia diversidad de hospederos que poseen los virus de tipo A, permiten la posibilidad de un reordenamiento de los genes, que puede originar una nueva variante de virus con suficientes diferencias antigénicas, capaces de producir una nueva pandemia (Longo *et al.*, 2012).

El virus A H1N1(pdm09), se sabe es el resultado de un realineamiento genético causado por una infección múltiple (Figura 2), esto ocurre cuando distintas cepas infectan a un hospedero simultáneamente. Este virus pandémico, contiene los genes de HA, PA, NP, PB2 y genes NS, asociados a la Influenza que afecta a los

cerdos de América del Norte, que provienen de un previo reordenamiento genético del virus de Influenza porcina, Influenza aviar e Influenza humana H3N2. Los dos genes restantes, son relacionados con la proteína de matriz (M) y la NA, genes asociados al virus causante de Influenza porcina que solo se encontraba en cerdos de Eurasia (Smith *et al.*, 2009 y Dawood *et al.*, 2009).

Para que una infección por Influenza inicie, el virus reconoce específicamente un receptor (glicolípido) para cada hospedero. En el caso de las aves, las células bronquiales no ciliadas, alveolares y de membrana conjuntiva son el blanco de infección de estos virus, ya que en su membrana celular expresan el receptor 2,3 ácido siálico, el cual es reconocido por la HA viral para ingresar a la célula; con respecto a los seres humanos las células diana del virus, son las células epiteliales de la cavidad nasal, faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos que expresan el receptor 2,6 ácido siálico. En el caso de los cerdos, que es el hospedero donde comúnmente ocurren las infecciones múltiples, ambos receptores son expresados simultáneamente sobre la membrana celular de su epitelio respiratorio. (Zhou *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Reordenamiento genético que dio origen al virus de Influenza A H1N1(pdm09). Diferentes tipos de virus infectan al mismo tiempo a un hospedero. El nuevo virus contiene 8 segmentos de ARN viral, polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa ácida (PA), hemaglutinina (H1), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (N1), proteína de matriz (M) y proteínas no estructurales (NS), provenientes de Influenza porcina clásica, Influenza aviar de Norteamérica e Influenza Euroasiática tipo porcina (Modificada de Neumann *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Proteínas virales

Para sintetizar sus distintas proteínas, el virus emplea marcos de lectura abiertos en un gen, los cuales son secuencias definidas de tres nucleótidos que le permiten al virus sintetizar distintas proteínas a partir de un único gen (Talledo y Zumaeta, 2009). Los ocho genes contenidos en la nucleocápside, contienen aproximadamente 13,500 nucleótidos que codifican para las siguientes proteínas: Proteína Hemaglutinina (HA), es un homotrímero que se encuentra expresada en la superficie de la envoltura viral y es el componente glicoproteico más importante

del virus, ya que es la responsable de reconocer el ácido siálico que es un receptor de membrana expresado en las células hospederas; además es uno de los principales antígenos del virus, por lo que es fundamental en la activación de la respuesta inmune y la producción de anticuerpos neutralizantes. La Neuraminidasa (NA), es otra glicoproteína, la cual forma un homotetrámero que se expresa en la superficie de la envoltura del virus; su función principal es la liberación de las partículas virales, ya que degrada al ácido siálico de la membrana celular. De la misma manera que la HA, esta proteína contiene determinantes antigénicos específicos para cada cepa, lo que juega un papel importante en la respuesta inmune del hospedero (Reina, 2002).

El espacio que existe entre la envoltura del virus y la nucleocápside, se encuentra ocupado por la proteína de matriz M1, que es el mayor componente proteico del virus, su función está involucrada en la maduración de la partícula viral y juega un papel importante en la estabilización de la cubierta del virus, así como en su ensamblaje. La otra proteína de membrana que se sintetiza, es la proteína M2, que forma un canal iónico para la acidificación del endosoma, que permite la liberación del ARN viral en el citoplasma de la célula, el cual es transportado al núcleo para comenzar su ciclo replicativo. Asimismo, el virus contiene proteínas no estructurales (NS): la proteína NS1 que funciona como antagonista de interferón y reguladora postranscripcional y la NS2 o NEP que participa en el transporte de las moléculas virales sintetizadas, funcionando como factor nuclear de exportación (Longo *et al.*, 2012).

Dentro de la nucleocápside, el genoma viral se encuentra asociado a la nucleoproteína NP, la cual está involucrada en el transporte citoplasmático del ARN viral al núcleo de las células. De igual manera, dentro de la cápside, se encuentra expresado el complejo enzimático de polimerasas, el cual es sintetizado a partir de los tres fragmentos más grandes del genoma viral y está constituido por tres diferentes tipos de polimerasa: Polimerasa básica 1 (PB1), Polimerasa básica 2 (PB2) y Polimerasa ácida (PA), que son indispensables para la replicación y transcripción del virus (Talledo y Zumaeta, 2009).

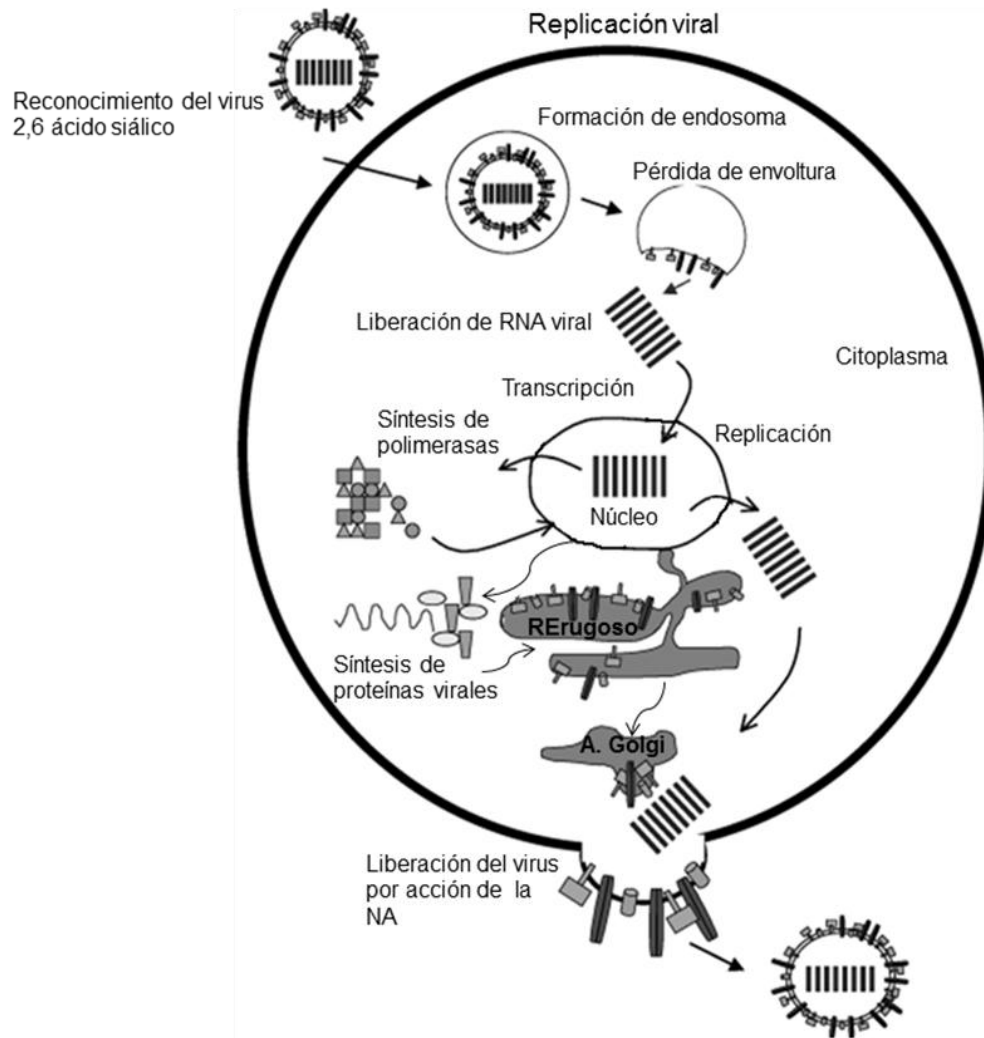
### 1.3.2 Ciclo replicativo

Después de la entrada al hospedero por contacto directo con el virus y la penetración a la capa de mucina del epitelio del tracto respiratorio, se da el primer contacto con la célula para comenzar con la infección, que es el reconocimiento de las células epiteliales ciliadas por medio de la unión de la HA con la galactosa del receptor 2,6 ácido siálico de la célula hospedera. (Zhou *et al.*, 1999).

Posterior al reconocimiento del ácido siálico de la membrana celular, el virus ingresa por endocitosis, formándose primeramente una vesícula que contiene al virus y se fusiona internamente con el endosoma. Conforme este realiza su recorrido al interior de la célula, el endosoma se va acidificando debido a la entrada de protones (H<sup>+</sup>), en donde se observa la participación de la proteína viral M2 por medio de canales iónicos, esto hace que la nucleocápside se libere en el citoplasma, debido a la fusión de la membrana del virus con la membrana del endosoma. Una vez en el citoplasma, las ribonucleoproteínas virales ingresan al núcleo a través de poros nucleares, para comenzar con la replicación del genoma viral, procesos que son realizados por las polimerasas virales y desencadenan en el hospedero la expresión de citocinas proinflamatorias. Debido a que son virus de sentido negativo, es necesaria una transcripción de la cadena de ARN usando las polimerasas que el virus trae consigo, para obtener una cadena de sentido positivo, la cual funciona como molde de ARN mensajero para la síntesis de proteínas virales. Realizada la transcripción del ARN viral, los ribosomas de la célula comienzan con la síntesis de proteínas virales, las cuales son transportadas a distintos organelos dentro de la célula para posteriormente ensamblar a la partícula viral. Los componentes proteicos sintetizados para la formación de las ribonucleoproteínas y la nucleocápside, son exportadas de nuevo al núcleo hasta que la partícula viral esté lista para ser ensamblada; por otra parte, las proteínas de membrana son transportadas y modificadas en el aparato de Golgi para finalmente ser insertadas en la membrana celular. Finalmente, el virus es ensamblado y permanece unido a la membrana celular hasta el momento de su liberación, acción que se realiza con ayuda de la NA, que degrada el receptor de



ácido siálico, llevándose consigo parte de la membrana celular que es utilizada por el virus como envoltura (Zhou *et al.*, 1999 y Longo *et al.*, 2012) (Figura 3).



**Figura 3.** Replicación del virus Influenza A H1N1. El inicio de la infección comienza con el reconocimiento de la HA con la galactosa del ácido siálico de la célula hospedera y el ingreso del virus se da por medio de la formación de un endosoma, en el cual existe un aumento de pH que facilita la liberación del ARN viral en el citoplasma, el ARN viral es replicado en el núcleo y el ARNm es transcrito en el citoplasma por polimerasas virales para la síntesis de sus proteínas. Las cuales son procesadas por el retículo endoplásmico rugoso (RERugoso) y posteriormente por el aparato de Golgi (A. Golgi), para migrar hacia la membrana celular, donde es ensamblado el virus para su liberación por efecto de la NA.

### 1.4 Respuesta Inmune

Una vez que el virus se ha implantado en el epitelio de las vías respiratorias, comienza a replicarse y diseminarse en el tracto respiratorio, causando la

descamación de las células ciliadas y células secretoras de moco. Como primeras respuestas del organismo contra la infección, debido a la liberación de distintos antígenos virales, se provoca el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas y linfocitos para dar inicio a la respuesta inmune del hospedero. Para este tipo de infecciones, la respuesta inmune innata, comprende una serie de interacciones complejas a nivel celular, entre ellas la expresión de distintos tipos de moléculas como interferón, citocinas proinflamatorias e interleucinas, las cuales se han reportado con expresiones diferenciales entre personas en contacto, controles y pacientes con enfermedades agudas asociadas al virus de Influenza A H1N1, entre las moléculas que se han reportado, se encuentran el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas como IL6 e IL8; que son activadas a partir del reconocimiento de moléculas virales a través de receptores tipo Toll 8 (TLR8) en las células (Bautista *et al.*, 2013 y Zúñiga *et al.*, 2011).

Además de la activación de la inmunidad innata del hospedero, se tiene otra estrategia que comprende a la inmunidad adaptativa, la cual genera anticuerpos contra los antígenos HA y NA, los anticuerpos dirigidos hacia la HA, tienen como función neutralizar al virus impidiendo la unión con el receptor ácido siálico, por otro lado, los anticuerpos contra la NA, reducen la eficiencia de la liberación del virus de las células infectadas y así evitar que se infecten otras células. Este tipo de respuesta incluye la inmunidad humoral e inmunidad celular, la primera la realizan los linfocitos B y la segunda es mediada por los linfocitos T. Para que el virus sea reconocido por este tipo de inmunidad, es necesario que sea digerido por las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, etcétera) y que sea fragmentado en el interior de estas células hasta formar ciertos péptidos que se unen a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), las cuales llevan los péptidos a la superficie celular donde serán reconocidos a través de su receptor. Posterior a la presentación de antígeno en las células, comienza el reclutamiento de distintos linfocitos y células especializadas en la destrucción de las células infectadas para combatir la infección. Finalmente, como parte de este proceso inmunológico, se forman

células de memoria, que constituyen un factor importante para la protección contra futuras infecciones por el mismo tipo de virus de Influenza (Longo *et al.*, 2012).

### **1.5 Panorama actual de Influenza en México**

La vigilancia es un factor importante en el desarrollo y prevención de Influenza en nuestro país, ya que con ella se detectan de manera temprana los primeros brotes de enfermedad, para así poder alertar y comenzar con las acciones de respuesta que se requieran tomar en la población ante un nuevo brote. En la República Mexicana la vigilancia de Influenza es realizada mediante un sistema centinela recomendado por la OMS, denominado Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Influenza (SISVEFLU), que forma parte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y es coordinado por la Dirección General de Epidemiología (DGE) (Secretaría de Salud, 2014).

La DGE registra para cada temporada de frío, los casos de Influenza confirmados por alguna prueba de laboratorio para cada subtipo del virus, cada temporada invernal abarca desde la semana epidemiológica 40 del año en curso hasta la semana epidemiológica 20 del siguiente año. En la temporada de invierno 2013-2014, es decir hasta la semana 20 del año 2014, se registraron 8,621 casos confirmados y 1,082 defunciones por alguno de los siguientes subtipos de virus: Influenza A, Influenza B, Influenza A H1N1(pdm09), Influenza A H1 e Influenza A H3N2; los cuales circulan en nuestra población y son considerados endémicos, es decir, que habitualmente se encuentran en la población mexicana y por ende se muestra protección inmunológica ante ellos. Para la temporada de frío 2014-2015, la cual inició en la semana 40 del año 2014, hasta el momento se tienen confirmados 2,515 casos y 59 defunciones. Los grupos de la población que más se ven afectados incluyen a los adultos de los 25 a 59 años y el grupo comprendido de 65 años o más. Sin embargo, las defunciones que se han presentado, han sido principalmente en el grupo comprendido de 55 y 59 años de edad; un factor importante en estas infecciones son las enfermedades crónicas, ya

que arriba del 95% de los pacientes que fallecieron presentaban una o varias enfermedades crónicas (Secretaría de Salud, 2014).

## **1.6 Proteoma**

Las proteínas son moléculas principales que participan en todas las funciones de una célula. Al conjunto de la expresión de estas moléculas, se le denomina proteoma y se ve modificado de acuerdo al momento del ciclo celular, diferenciación, función celular y la respuesta hacia ciertos estímulos como sucede en las enfermedades, donde se da un cambio en la expresión de genes y se producen variaciones de las modificaciones post-traduccionales en las proteínas. La proteómica utiliza diversas estrategias para separar e identificar proteínas diferencialmente expresadas, las cuales posteriormente son validadas para el estudio de posibles biomarcadores (Anderson *et al.*, 1998).

Debido a que el estudio del proteoma proporciona una visión más aproximada del estado biológico de las células en una condición determinada, es sumamente importante su estudio en la proteómica clínica. En la actualidad su principal enfoque es el diagnóstico y el descubrimiento de biomarcadores que sean utilizados como posibles blancos terapéuticos, fármacos, vacunas o como prevención a enfermedades (Mischak *et al.*, 2007).

### **1.6.1 Biomarcadores proteicos**

Los biomarcadores son sustancias específicas que son posibles de cuantificar y que sirven como indicadores de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas. El objetivo del descubrimiento de biomarcadores proteicos, es identificar una proteína o grupo de proteínas que sean diferenciales entre pacientes y personas sanas; cabe mencionar que un biomarcador ideal, es aquel que se encuentre en una muestra biológica que pueda obtenerse de una forma no invasiva (González-Buitrago *et al.*, 2008).

Los biomarcadores al igual que cualquier prueba clínica, deben poseer sensibilidad y especificidad. La sensibilidad, mide la capacidad para identificar una enfermedad cuando el biomarcador está presente; y la especificidad, que hace referencia a la capacidad de poder descartar la enfermedad cuando el biomarcador esté ausente. Estas características dependen de la prevalencia de la enfermedad que se estudia, una enfermedad con baja prevalencia en la población facilita la existencia de falsos positivos y por el contrario, en una enfermedad con alta prevalencia, se obtiene un número alto de falsos negativos. De igual manera, el nuevo biomarcador debe ser robusto, es decir, comportarse siempre de forma análoga (LaBaer *et al.*, 2005).

### **1.6.2 Estrategias proteómicas**

La proteómica ha desarrollado para la separación e identificación de proteínas en el estudio de biomarcadores dos grandes estrategias: una de ellas llamada *shot-gun* o conocida con el nombre de “proteómica de escopetazo”, que comienza con el tratamiento de la muestra con una enzima específica (tripsina), la cual fragmenta a las proteínas entre los residuos de Arginina y Lisina, generando un patrón de péptidos específico. Los péptidos resultantes son separados por cromatografía multidimensional y fragmentados por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), por último los espectros de masa de los péptidos que fueron fragmentados, son analizados con un programa bioinformático que emplea un estadístico (Paragon o Mascott), el cual utiliza las bases de datos en línea para la identificación de las proteínas de la muestra. La otra estrategia se denomina *up-down* (arriba-abajo), en la cual se intenta separar el mayor número posible de proteínas, mediante técnicas como electroforesis bidimensional o sistemas multidimensionales. Una vez separadas las proteínas, se les da un tratamiento con tripsina para fragmentarlas, los péptidos resultantes son analizados por espectrometría de masas y las proteínas presentes en la muestra son identificadas mediante análisis bioinformáticos usando bases de datos que se encuentran en línea. Ambas estrategias confieren ventajas y desventajas, no obstante la elección de un método depende por completo de los objetivos del estudio. Por ejemplo, la

ventaja de la estrategia arriba-abajo, proporciona información sobre las cantidades de las proteínas y su estructura. Por otra parte, la principal ventaja de la estrategia de abajo-arriba, es la mayor resolución en las separaciones cromatográficas de los péptidos, comparados con las proteínas (González-Buitrago *et al.*, 2008).

### 1.6.3 Tecnologías proteómicas

En el estudio del proteoma, es posible utilizar una de las siguientes técnicas para la separación de proteínas, la cual es acoplada a un método de identificación.

#### *Técnicas para separar proteínas:*

Hasta este momento, la técnica fundamental de separación de las proteínas para los estudios proteómicos, ha sido la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), descrita por primera vez en 1975 por O'Farrell y Klose, la cual separa a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) y su tamaño. Esta técnica permite la separación en un único gel de varias especies de proteínas, incluidas las formas modificadas. Sin embargo, la 2D-PAGE tiene algunos inconvenientes en la separación de proteínas muy básicas, muy ácidas, las hidrófobas y las pequeñas (González-Buitrago, 2008).

Debido a que uno de los principales objetivos de la búsqueda de biomarcadores es analizar la expresión diferencial, se deben de analizar las manchas o *spots* que se vean modificadas en abundancia, que aparezcan o desaparezcan. Para esto se utilizan estrategias analíticas como la electroforesis bidimensional en geles diferenciales (DIGE), que es una variación de la electroforesis bidimensional clásica; en esta técnica se utilizan colorantes fluorescentes con diferentes tamaños y cargas (derivados de CyDye 2, CyDye 3 y CyDye 5), los cuales son detectados a longitudes de onda específicas para marcar de forma covalente las proteínas de las dos muestras que van a ser comparadas. En esta técnica se utiliza un estándar interno, marcado por el fluorocromo Cy Dye 2, que es una referencia interna del gel que ayuda a limitar la variación del sistema. Se mezclan las muestras una vez marcadas las proteínas con los colorantes, y se separan en

un único gel bidimensional según su carga y masa. Debido a que los fluorocromos utilizados para marcar las proteínas migran en la misma posición, se eliminan las diferencias debido al efecto del emparejamiento de las imágenes (Ünlü *et al.*, 1997).

El sistema de fluorocromos que se utiliza para el marcaje de proteínas, tiene un grupo reactivo NHS éster (N-**hidroxisuccinimida** éster), el cual está diseñado para unirse covalentemente al grupo amino épsilon del aminoácido lisina por entrecruzamiento de amida. El residuo de lisina cuando se encuentra a pH neutro o a pH ácido presenta una carga de +1 al igual que los fluorocromos, el cual al acoplarse a la lisina reemplaza la carga del residuo con su propia carga, lo que asegura que el punto isoeléctrico de las proteínas no sea modificado (Marouga *et al.*, 2005).

#### *Identificación de proteínas por espectrometría de masas:*

En los geles bidimensionales, las proteínas diferencialmente expresadas, se hidrolizan con tripsina y son identificadas por medio de espectrometría de masas. La técnica más común es la de “huellas peptídicas”, para lo cual, se tiene la necesidad de ionizar y volatizar los péptidos, utilizando cualquiera de los dos métodos: la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización por láser asistida (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), llamado MALDI. Al sistema de ionización de proteínas, se acopla un analizador de masas, que es el otro componente fundamental de los espectrómetros de masas. Los principales analizadores de masas que se utilizan en los estudios proteómicos, son los cuádruplos, los de trampa iónica y los de tiempo de vuelo (*time-of-flight*) o también llamados TOF. La combinación del sistema de ionización con el analizador de masas determina la aplicación del espectrómetro de masas. La ESI se acopla con frecuencia a las trampas iónicas y las combinaciones de cuádruplo/TOF (espectrómetro en tándem o MS/MS). La fuente de MALDI, normalmente se acopla con analizadores TOF (MALDI-TOF). Esta combinación se usa con frecuencia para obtener las huellas peptídicas (González-Buitrago *et al.*, 2008).

Otro método, el cual también es utilizado en la proteómica, son las separaciones en medio líquido o “shutgun”, que es la combinación de diversas técnicas cromatográficas y de electroforesis capilar. En una separación multidimensional, las proteínas o péptidos de la muestra se separan por un método y los componentes separados, se vuelven a separar por al menos otro método adicional independiente. La principal ventaja de estas técnicas, es que pueden acoplarse directamente en línea con los espectrómetros de masas (Stroink *et al.*, 2005).

### *Proteoma de suero sanguíneo*

Como se mencionó anteriormente un biomarcador debe de ser de fácil acceso y no ser una técnica invasiva para el paciente, por lo que los fluidos corporales como orina, líquido cefalorraquídeo, saliva y plasma, por mencionar algunos, son blancos de interés para el estudio de la proteómica (González-Buitrago *et al.*, 2008).

Por tal motivo, el plasma humano es una muestra fundamental para el diagnóstico de enfermedades y su control terapéutico. El plasma total de un adulto contiene entre 60 y 80mg/ml de proteínas, sin embargo, la concentración de cada tipo de proteína es muy variable, pueden existir proteínas como la albumina que presenta una concentración de entre 35 y 20 mg/ml, hasta otras como la IL-6 que presenta una concentración de alrededor de 2pg/ml. En él se encuentran proteínas que ejercen funciones específicas que suelen encontrarse en mayor concentración y representan el 99% del contenido proteico del plasma, entre ellas se encuentra la albumina, las inmunoglobulinas, las haptoglobinas y la transferrina, por nombrar algunas. El otro tipo de proteínas, se encuentran en una concentración menor y son las que son secretadas por las células y tejidos, es decir no tienen una función específica en el plasma y son el blanco en los estudios de la búsqueda de biomarcadores proteicos. No obstante, su estudio es más complicado en comparación con los tejidos o cultivos celulares. (Anderson *et al.*, 2002).

Se han realizado diversos estudios donde se evalúa el perfil proteómico en suero, con el objetivo de encontrar posibles biomarcadores o blancos terapéuticos. Sin



embargo, por ser de naturaleza muy compleja este tipo de muestra, se utilizan técnicas donde las proteínas minoritarias son separadas de las proteínas más abundantes que son albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina, y antitripsina. Para lograr este objetivo existen diversos sistemas, como el sistema de Multiple Affinity Removal Systems (Agilent Technologies), que se utiliza para concentrar las proteínas que se encuentran poco abundantes para los análisis en geles bidimensionales y seguir una estrategia proteómica acorde a los objetivos (Dardé *et al.*, 2006).

### **1.7 Estudios proteómicos en Influenza AH1N1**

Con el apoyo de las tecnologías proteómicas, las cuales son empleadas con el objetivo de profundizar en la búsqueda de nuevos marcadores biológicos y conocer las interacciones que se presentan entre virus-hospedero, se han realizado diversos estudios asociados a este tipo de virus, buscando proteínas expresadas diferencialmente como en el estudio realizado por Liu y cols. en 2012, quienes a partir del análisis proteómico en macrófagos infectados, reportan 106 proteínas que principalmente se encuentran relacionadas en las respuestas de inflamación e infecciones en macrófagos, de igual manera se observan proteínas de unión a calcio que son predominantemente expresadas en neutrófilos, monocitos y en la activación de macrófagos, además se observó una supresión de las histonas en células infectadas, esto puede ser debido a una posible estrategia del virus en la modificación de las actividades fisiológicas de las células hospederas, ya que este mecanismo también ha sido observado en infecciones del virus del Herpes simple.

Las células epiteliales de pulmón también han sido objeto de análisis proteómicos asociados a expresiones diferenciales, tanto totales como proteínas específicas del núcleo, mitocondria y citosol. En 2013, Zhao y cols. reportan 27 proteínas nucleares, 13 mitocondriales y 37 citosólicas, de las cuales solo se validaron MIF e ISG15 de la porción mitocondrial y UCHL1 y PDCD5 del citosol, las cuales se encontraron subexpresadas en células infectadas.

A pesar de que este tipo de estudios se han realizados en líneas celulares, el plasma también ha sido objeto de estudio. Zúñiga y cols. en 2011 y Bautista *et al.* en 2013, reportan expresiones diferenciales de citocinas, quimiocinas y factores angiogénicos entre casos y controles, algunos de ellos son: IL-1RA, IL-6, IL-7, CXCL8, CCL2 e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, son escasos los estudios que se han realizado en plasma para la obtención de biomarcadores en infecciones causadas por el virus A H1N1.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El virus Influenza A, es un patógeno que afecta principalmente a personas que se encuentran en contacto con animales como cerdos y aves, personas con problemas de inmunosupresión, niños, adultos mayores y personas que trabajan en el sector salud. Posee distintos hospederos, entre los cuales se encuentran aves, cerdos y humanos, además presenta una alta tasa de mutación debido a su tipo de genoma (ARNss-), en consecuencia, pueden surgir nuevas cepas para las cuales no seamos inmunológicamente competentes, por lo que es un agente que debe de estar en constante vigilancia epidemiológica, para así evitar epidemias o pandemias.

Se sabe que la Influenza afecta a diferentes células de las mucosas, células epiteliales ciliadas y alveolares de las vías respiratorias, esto tiene como consecuencia una modificación en la composición del proteoma y por ende en las concentraciones de proteínas que se encuentran en suero. Por tanto el análisis del proteoma en suero es de gran interés para la búsqueda de posibles biomarcadores de diagnóstico, fármacos o vacunas.

## **3. HIPÓTESIS**

Si las infecciones por el virus de Influenza A H1N1(pdm09) causan modificaciones del perfil proteómico en plasma, entonces podrán encontrarse proteínas que se encuentren diferencialmente expresadas en casos clínicos y controles.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Identificar de proteínas diferencialmente expresadas entre casos y controles en muestras de suero de pacientes con Influenza A H1N1(pdm09).

## 4.2 Objetivos Particulares

- Realizar geles DIGE en un rango de pH de 4-7 y 4.5-5.5 de 24cm
- Analizar los *spots* diferencialmente expresados con el software DECYDER (GE, Healthcare).
- Seleccionar, cortar y digerir con tripsina los *spots* provenientes de los geles DIGE.
- Analizar los péptidos resultantes de la digestión trípica por medio de espectrometría de masas (MS/MS).
- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas, utilizando los espectros de masa de los péptidos fragmentados con el software ProteinPilot™ (AB Sciex) en la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org>).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Obtención de las muestras**

Las muestras de suero total de pacientes y controles, fueron proporcionadas por el Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”.

#### *Criterios de Inclusión*

- Pacientes infectados: pacientes de cualquier edad y sexo, con diagnóstico clínico y confirmación por PCR tiempo real de Influenza AH1N1 pandémica, captados por la Subdirección de Investigación de los Servicios de Salud de Hidalgo.
- Controles: sujetos sanos que no hayan cursado por una infección viral al momento de la toma de sangre, sin enfermedades metabólicas, hipertensión y sin alergias.

#### *Criterios de Eliminación*

- Pérdida de la muestra por mal manejo.

### **5.2 Cuantificación de proteínas e integridad de las muestras**

Método 2-D Quant Kit (GE Healthcare)

Este ensayo se basa en la unión específica de los iones de cobre a la proteína, la absorbancia de la solución del ensayo disminuye con el aumento de la concentración de proteínas.

- Se eligieron 12 muestras de suero de pacientes y 12 muestras de controles, las cuales fueron diluidas en una proporción de 1:1000 con agua milli Q (MQ).

Para la cuantificación de proteína total en las muestras, fue necesario interpolar los valores obtenidos dentro de la curva de calibración (tabla 1), la cual se realizó con albúmina de suero bovino, con las siguientes concentraciones:

No. Tubo	1	2	3	4	5	6
<b>Volumen de la Solución BSA (2mg/ml)</b>	0µl	5µl	10µl	15µl	20µl	25µl
<b>Cantidad de proteína</b>	0µg	10µg	20µg	30µg	40µg	50µg

**Tabla 1.** Curva de calibración. Método 2-D Quant.

- Se utilizó 20µl de muestra para cuantificar, los cuales se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml. A cada tubo, se le adicionó 500µl de solución precipitante (pp), se homogeneizó durante 12 segundos y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Esto mismo se realizó con la curva de calibración.
- Al terminar la incubación, se adicionó 500µl de solución co-precipitante (co-pp), se homogeneizaron las muestras durante 12 segundos y se incubaron a una temperatura de -20°C durante 40 minutos.
- Los tubos se centrifugaron a 15,000rpm durante 16 minutos a 4°C y a cada tubo se le retiró un volumen de 950µl de sobrenadante en una centrifuga Allegra <sup>TM</sup> 25R (Beckman Coulter). Las muestras se centrifugaron nuevamente para eliminar el exceso de sobrenadante a 15,000rpm durante 6 minutos a 4°C.
- Para la hidratación de la proteína y marcaje con cobre, se adicionó a cada tubo 100µl de solución de cobre, más 400µl de agua MQ y se homogeneizó el contenido del tubo con ayuda de un vortex durante un minuto.
- Se adicionó 1ml de solución de trabajo a cada tubo, la cual se preparó previamente en una proporción de 100 partes del reactivo A por una parte del reactivo B. Los tubos fueron mezclados por inversión y se incubó las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Al término de la incubación, la absorbancia se leyó dentro de los primeros 40 minutos a partir de la adición de la solución de trabajo a una longitud de

onda de 480nm utilizando un espectrofotómetro DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter).

- Para el cálculo de la cantidad de proteína disuelta en la muestra, se realizó un análisis de regresión lineal con los valores de absorbancia de los tubos con BSA, donde la variable independiente fue la concentración estándar de BSA y la variable dependiente fue la absorbancia.
- Posteriormente las concentraciones de las muestras se interpolaron en el intervalo de la curva de calibración a partir de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

#### *Geles de integridad de las muestras*

- Se elaboraron dos geles de acrilamida al 12% (acrilamida-bisacrilamida 30%, TRIS 1.5M pH8.8, SDS 10%, persulfato de amonio al 10%, y TEMED 10%) de 1mm de grosor.
- En el gel se cargaron 20µg de proteína de cada muestra, el volumen variable de cada una de ellas se diluyó en una proporción 1:1 (v/v) con buffer de carga de Laemmli 2X (950µl de buffer de carga Laemmli más 50µl de β-mercaptoetanol). Los tubos se incubaron durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización de las proteínas.

La electroforesis se realizó en buffer de corrida SDS-Laemmli 1X (100ml de buffer Laemmli 10X Tris/Glicina/SDS y 900ml de agua MQ), en la cámara electroforética Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad). Utilizando las siguientes condiciones:

- 60Volts/15 minutos
- 100Volts/90 minutos

Al final de la electroforesis los geles fueron teñidos utilizando Azul de Coomassie 1X (Metanol 50%, Ácido Acético10%, Azul Brillante R-250).

- Cada uno de los geles se colocó en agitación suave dentro de la solución de Coomassie, durante 12 horas aproximadamente.
- Al finalizar el tiempo de tinción, la solución se decantó y se realizó el lavado de los geles con la solución para desteñir (Metanol al 40% y Ácido Acético al 10%), colocándolos en agitación suave aproximadamente una hora, en un agitador de acción dual MAX-Q 2508 (Barnstead).

Al terminar los lavados de los geles, fueron escaneados utilizando el escáner ImageScanner, #mod: 1120UDS (Amersham Bioscience).

### **5.3 Enriquecimiento de proteínas minoritarias de las muestras**

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

*Fase móvil:*

- Buffer de equilibrio (buffer A), #Part: 5185-5987, Agilent Technologies
- Buffer de elución (buffer B), #Part: 5185-5988, Agilent Technologies.

*Fase estacionaria:*

- Columna de afinidad Multiple Affinity Removal Column 4.6mm x 100mm, #Serial: 100330207C, Agilent Technologies.

*Preparación de las muestras y equipo*

- Se realizó la mezcla un grupo control (*pool*), integrado por 12 muestras previamente cuantificadas, y otro *pool* integrado por 12 casos clínicos. Cada muestra de suero aportó 2g de proteína al grupo, por lo que se obtuvo la cantidad total de 24g por cada uno de los dos grupos.
- Cada *pool* se diluyó en una proporción de 1:4 (v/v), en buffer A. Posteriormente se filtró la muestra mediante una unidad de filtración para jeringa (MILLIPORE) con membrana Express® PES de 0.22µm.



- Con respecto al equipo, este se acondicionó empleando 1 litro de buffer A, buffer B y agua MQ, los cuales se filtraron previamente al vacío con una membrana (MILLIPORE) de 0.45µm, en agitación constante y por último, se les eliminó el gas utilizando un baño ultrasónico, #mod: 08895-04 (Cole – Parmer).
- Como fase estacionaria se utilizó el sistema *Multiple Affinity Removal System* (Agilent Technologies), el cual está basado en una columna de afinidad (Multiple Affinity Removal Column 6Hc de 4.6mm x 100mm, Agilent Technologies) capaz de retener las seis proteínas más abundantes del suero (albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina y antitripsina), ya que contiene una serie de anticuerpos policlonales con especificidad para estas proteínas. El enriquecimiento de las proteínas minoritarias, se realizó bajo las siguientes condiciones con el gradiente de elución que se muestra en la tabla 2.

*Condiciones cromatográficas:*

- Longitud de onda: 280 nm.
- Límite de presión: 60 bar equivalentes a 870 psi.
- Temperatura de las muestras: 15 °C.
- Temperatura de la columna: 20 °C aproximadamente.
- Volumen de inyección: 60 µl de muestra.
- Tiempo de la corrida: 28 minutos.

*5.4.2 Gradiente de elución:*

Tiempo (minutos)	% Buffer A	%Buffer B	Velocidad de flujo (ml/min)
<b>0.00</b>	100	0.0	0.125
<b>18.00</b>	100	0.0	0.125
<b>18.00</b>	100	0.0	1.000
<b>20.00</b>	100	0.0	1.000

<b>20.00</b>	0	100	1.000
<b>27.00</b>	0	100	1.000
<b>27.01</b>	100	0.0	1.000
<b>38.00</b>	100	0.0	1.000

**Tabla 2.** Gradiente de elución para el enriquecimiento de las proteínas minoritarias de los dos grupos, con la columna de afinidad Multiple Affinity Removal Column 4.6mm x 100mm.

- Por cada grupo se realizaron 6 inyecciones de 60µl, con un flujo de 0.125ml/min. De cada inyección se colectó la primera fracción de proteínas dentro del intervalo de 2-4.5 minutos, que corresponde a las proteínas de menor abundancia, estas fueron colectadas en tubos eppendorf de 1.5ml y guardadas a -20°C hasta su uso. Posteriormente fueron liberadas entre el rango de 12-13.5 minutos las proteínas de mayor abundancia que quedaron retenidas en la columna.

#### **5.4 Geles de electroforesis diferencial. *Difference Gel Electrophoresis (DIGE)***

- A partir del enriquecimiento de las proteínas minoritarias de las muestras, se obtuvo aproximadamente un volumen de 7ml por cada grupo, el cual se concentró en unidades de ultrafiltración AMICON, (MILLIPORE), centrifugándolas a 4,100rpm a 4°C durante 60 minutos.
- Cada grupo se desaló, debido a que la presencia de sales en la muestra, interfiere en el proceso de isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas. Por lo que la muestra que quedó retenida en la parte superior de la unidad AMICON, se lavó por medio de pipeteo con 1ml de Tris 10mM y posteriormente se centrifugó el contenido del AMICON con las mismas condiciones del paso anterior.
- Se colectó únicamente el líquido retenido por la unidad AMICON en un tubo eppendorf de 1.5ml y se almacenó a -20°C hasta su uso. Posteriormente se cuantificó cada grupo por el método 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

### *Marcaje de proteínas*

Para el marcaje de proteínas se utilizó el kit *Amersham™* CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) para geles 2D DIGE (GE Healthcare).

- Se realizó previamente una reconstitución de los fluorocromos CyDye 2, CyDye 3 y CyDye 5 en 5  $\mu$ l Dimetilformamida anhidro (DMF) y se obtuvo una concentración final de 1 nmol/ $\mu$ l. Los viales fueron homogeneizados durante 30 segundos en el vortex y centrifugados a 8,000rpm por 30 segundos. El stock se guardó a -20°C en oscuridad.
- Para la solución de trabajo, se tomó 1  $\mu$ l de cada solución stock CyDye y se adicionó 3  $\mu$ l de DMF para obtener una concentración de 0.25nmol/ $\mu$ l. A partir de este momento se manipularon los tubos con los fluorocromos en oscuridad total.
- En un tubo de microcentrifuga, se colocó la cantidad de volumen suficiente para marcar 50 $\mu$ g de proteína de la muestra de casos con 400pmol del fluorocromo Cy3, esto mismo se realizó con la muestra de controles que fue marcada con el fluorocromo Cy5. Y finalmente para el estándar interno, se utilizó el fluorocromo Cy2, con el cual se marcaron 50 $\mu$ g de proteína (25 $\mu$ g de proteína del grupo de controles y 25 $\mu$ g de casos). La reacción del marcaje se llevó a cabo en un rango de pH de 8.0-9.0, utilizando TRIS 60mM.
- Los tubos fueron homogeneizados con un vortex y colocados en hielo durante 30 minutos.
- Para detener la reacción, se agregó 1 $\mu$ l de lisina 10mM y se mezcló por pipeteo. Posteriormente las muestras fueron colocadas nuevamente en hielo por 10 minutos.

### *Isoelectroenfoque (IEF)*

Para la realización del IEF se utilizaron tiras IPG de 24 cm con gradiente inmovilizado de pH 4-7 (Bio-Rad) y tiras Immobiline DryStrip pH 4.5-5.5 (GE, Healthcare).

- La hidratación de cada tira se realizó con 150µg de proteína (correspondiente a la mezcla de cada uno de los grupos marcados con Cy2, Cy3 y Cy5), aproximadamente 60 µl, los cuales se llevaron a un volumen total de 360µl con solución de rehidratación buffer DeStreak (GE Healthcare).
- Para hidratar las tiras, se colocaron las tiras de acrilamida en un IPG box (GE Healthcare) y sobre ellas la solución de proteínas con el buffer DeStreak, se cerró por completo el IPG box (GE Healthcare), aislándola por completo de la luz y se dejó aproximadamente durante 16 horas.
- Después de la hidratación de las tiras, se preparó la cámara de porcelana del sistema de IEF Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), colocando 9ml de aceite mineral a las tiras.
- Las tiras fueron removidas de la cámara de rehidratación y colocadas en la cámara de porcelana (GE Healthcare) con el extremo positivo (+) en la parte posterior y el extremo negativo (-) en la parte anterior. Se colocó una almohadilla humedecida con agua destilada en cada uno de los polos de la tira haciendo contacto con la acrilamida de la misma y finalmente se colocaron los electrodos haciendo contacto con las almohadillas y la parte metálica de la cámara de IEF.
- El IEF de la tira de pH con rango 4-7 se realizó bajo las siguientes condiciones:

Pasos	Volts (V)	Vh
<b>1 Intensificar y mantener</b>	100	100
<b>2 Intensificar y mantener</b>	500	500
<b>3 Gradiente</b>	1000	800
<b>4 Gradiente</b>	10000	16500
<b>5 Intensificar y mantener</b>	10000	34700

**Tabla 3.** Condiciones de isoelectroenfoque para tiras de pH con rango 4-7 de 24cm.

- Tiempo total: 9:32 hrs.
- Total Vh: 52600
- Corriente/tira: 75 $\mu$ A
- Temperatura: 20°C

- Condiciones para la tira de acrilamida con el rango de pH 4.5-5.5:

Pasos	Volts (V)	Vh
<b>1 Intensificar y mantener</b>	100	100
<b>2 Intensificar y mantener</b>	500	1000
<b>3 Gradiente</b>	1000	1500
<b>4 Gradiente</b>	10000	16500
<b>5 Intensificar y mantener</b>	10000	76000

**Tabla 4.** Condiciones de isoelectroenfoque para tiras de pH con rango 4.5-5.5 de 24cm.

- Tiempo total: 15:36 hrs.
- Total Vh: 95100
- Corriente/tira: 75 $\mu$ A
- Temperatura: 20°C

## Segunda dimensión de geles DIGE

Para la elaboración del cassette para el gel de acrilamida, se utilizó el sistema Ettan DALT*twelve System Ettan* gel caster, el cual tiene una capacidad de 12 geles. Para este sistema se utilizan blancos separados por una mica transparente cuando no se realizan todos los geles, debido a que es necesario montar el sistema ocupando los 12 lugares.

- El sistema Ettan DALT*twelve System Ettan* gel caster se ensambló utilizando los blancos necesarios y se cerró por completo el sistema para evitar posibles fugas a la hora del vaciado de la solución de acrilamida.
- Por cada gel se prepararon 100ml de solución de acrilamida al 12% (acrilamida-bisacrilamida 30%, TRIS 1.5M pH8.8, SDS 10%, persulfato de amonio al 10%, y TEMED 10%).
- Para el llenado del sistema Ettan DALT*twelve System Ettan* gel caster, se preparó buffer de desplazamiento (tabla 5), el cual empuja la solución de acrilamida para el llenado y elaboración de los geles.

Reactivos	Cantidad
<b>Tris 1.5M pH8.8</b>	25ml
<b>Glicerol</b>	50ml
<b>Azul de bromofenol</b>	2mg
<b>Agua destilada</b>	25ml
<b>Total</b>	100ml

**Tabla 5.** Buffer de desplazamiento para la elaboración de geles de 24cm.

- La solución de acrilamida al 12% se adicionó al sistema Ettan DALT*twelve System Ettan* gel caster a través del tubo alimentador, seguido del buffer de desplazamiento.
- Al concluir el llenado de los geles, se le adicionó en la parte superior a cada uno de ellos etanol al 70%, sin mezclar la acrilamida y hasta cubrir por completo la superficie del gel, con ayuda de una pipeta Pasteur y un bulbo. Posteriormente, se dejaron polimerizar los geles toda la noche a temperatura ambiente.
- Al concluir el IEF de las tiras, estas se retiraron de la cámara de IEF y se lavaron con buffer de corrida SDS-Laemmli 1X para eliminar el exceso de aceite mineral.
- Para equilibrar cada tira se preparó previamente 50mg de DTT en 5ml de buffer de equilibrio (Tris HCl 75mM, Urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%),

posteriormente se incubó la tira en esta solución 15 minutos en agitación suave en total oscuridad y a temperatura ambiente.

- Durante la incubación de la tira, se preparó una solución con 125mg de iodoacetamida para la alquilación de las proteínas en 5ml de buffer de equilibrio. Al terminar la incubación, se reemplazó la solución de DTT por la solución de iodoacetamida, se incubó la tira en agitación suave durante 15min en total oscuridad y a temperatura ambiente.
- La tira equilibrada y alquilada, se lavó con buffer de corrida SDS-Laemmli 1X y se colocó cuidadosamente sobre el gel de acrilamida con ayuda de pinzas. El gel se selló con agarosa al 0.5% evitando la formación de burbujas, la agarosa se dejó solidificar el tiempo suficiente y finalmente el gel se colocó dentro de la cámara del sistema de electroforesis Ettan DALTtwelve.
- Para la corrida de electroforesis, se adicionó a la cámara de electroforesis Ettan DALTtwelve System 9 litros de buffer de corrida SDS-Laemmli 1X. Posteriormente se colocaron los blancos necesarios y por último se colocó dentro de la cámara el gel con la tira sellada con agarosa.
- La cámara de electroforesis se cubrió con papel aluminio y se realizó la corrida electroforética con las siguientes condiciones:
  - Volts constantes: 90V
  - Corrida: continua
  - Bomba: automática
  - Temperatura: 25°C
  - Tiempo: 20 horas

### *Escaneo de geles*

- Al terminar la electroforesis, el gel fue montado en el cassette del escáner y este se colocó en el equipo Ettan DIGE Imager. La adquisición de imágenes se realizó con ayuda de software Ettan DIGE Imager para el sistema CyDye Fluor minimal Labelling con las siguientes condiciones (tabla 6):

Canal 1	Canal 2	Canal 3
<b>Dye: Cy2</b>	Dye: Cy3	Dye: Cy5
<b>Filtro de excitación (nm): 480/30</b>	Filtro de excitación (nm): 540/25	Filtro de excitación (nm): 635/30
<b>Filtro de emisión (nm): 530/40</b>	Filtro de emisión (nm): 595/40	Filtro de emisión (nm): 680/30
<b>Exposición: 0.8</b>	Exposición: 0.30	Exposición: 0.50

**Tabla 6.** Condiciones para el escaneo de las imágenes de geles DIGE

- Una vez obtenidas las imágenes de fluorescencia, inicialmente se realizó el “merge” con el software ImageQuant (GE Healthcare) y seguido a esto, se realizó el análisis diferencial en gel o *Differential In-gel Analysis* (DIA) de cada imagen con el software DeCyder 2-D Differential Analysis (GE Healthcare), utilizando una co-detección automatizada.
- Posterior al análisis DIA, se realizó la sustracción de fondo o *background* y la normalización de los *spots* en relación al estándar interno colocado en el gel. Asimismo, se realizó la cuantificación de los *spots* en las imágenes de cada grupo. La definición de los límites de cada *spot*, se llevó a cabo utilizando los datos de los píxeles de las imágenes solas, así como la imagen del “merge”.
- Se midió la abundancia de los *spots*, con la comparación del volumen de cada uno de los *spots* con respecto a su estándar interno. Por último, se analizaron los datos entre los dos grupos experimentales con el estadístico de la prueba t de Student.

### 5.5 Espectrometría de masas

- Previamente se rehidrató Tripsina liofilizada (Promega V528A) con 1ml de ácido acético 50mM para obtener una concentración de 100 µg/ml y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.
- A partir del análisis de los geles utilizando el software DeCyder, se eligieron 10 *spots* con aumento de abundancia en su expresión, adicionalmente se



eligió un *spot* estándar como control de digestión. Todos los *spots* fueron cortados manualmente con ayuda de una punta según el tamaño del *spot* y colocados en tubos de 0.6 ml.

- Se agregó a cada tubo, 100µl de Acetonitrilo (ACN) al 100% sobre las piezas de gel, las cuales se dejaron deshidratar a temperatura ambiente hasta que las piezas se tornaron de color blanco opaco y redujeron su tamaño. Se removió el exceso de ACN y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. En este paso se preparó Tripsina [20µg/ml] en AB40 (ACN 10% y Bicarbonato de amonio 40mM).
- Se agregaron 10µl de Tripsina [20µg/ml] a cada pieza de gel y se dejó a temperatura ambiente durante una hora. Para las piezas que no se hidrataron fue necesario adicionar 10 µl más de Tripsina [20µg/ml] e incubar nuevamente por una hora. Pasado este tiempo se removió el exceso de solución y a cada tubo se le agregó 20 µl de AB40. Finalmente las piezas de gel se quedaron en digestión toda la noche a 37°C.
- Al siguiente día, se agregó a cada tubo 20 µl de Bicarbonato de amonio 50mM y durante 10 minutos las muestras fueron mezcladas intermitentemente con ayuda de un vortex. Posteriormente, se colectó la muestra por medio de centrifugación durante 30 segundos y el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de 0.6ml.
- A cada pieza de gel, se le agregó 20 µl de buffer de extracción de péptidos (50% acetonitrilo (v/v) y 5% (v/v) ácido fórmico) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, mezclando intermitentemente. Las muestras se centrifugaron nuevamente durante 30 segundos y se recolectó el sobrenadante, el cual se agregó al recuperado anterior. Esto se realizó dos veces más a todas las muestras.
- El volumen total del extracto se redujo con un concentrador (Eppendorf 5301), con la opción de soluciones líquidas acuosas sin temperatura y con vacío aproximadamente una hora, sin dejar secar. Sin embargo, para las muestras que les sucedió esto, se reconstituyeron con 10 µl de solución de ACN en agua a una dilución de 1:20.

- Posteriormente se midió el pH de los péptidos con una tira reactiva y se ajustó a un pH  $\leq 4$  con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%.
- Para el lavado de los péptidos, fue necesario acondicionar la columna ZipTip, la cual se lavó con 10  $\mu$ l de ACN, los cuales fueron desechados en un pañuelo desechable (kimwipe), esto se realizó dos veces más. A continuación la columna se lavó tres veces más con 10  $\mu$ l de solución de equilibrio (TFA 1:1000 en agua MQ).
- Se tomaron 10  $\mu$ l de la solución con los péptidos provenientes de la digestión proteica, los cuales fueron mezclados por pipeteo aproximadamente 6 veces, esto para adherir los péptidos a la columna.
- Una vez hecho esto, se tomaron 10  $\mu$ l de solución de equilibrio y se desecharon en un kimwipe. Esto se realizó 3 veces más para el lavado de los péptidos.
- Para la elución de los péptidos, fue necesario colocar 10  $\mu$ l de solución de elución (TFA 1:1000 con ACN al 50%), en tubos nuevos de 0.6ml, uno para cada muestra. Para eluir los péptidos unidos a la columna, esta se lavó por pipeteo 6 veces con los 10  $\mu$ l de solución de elución.
- Con respecto a la matriz, esta se preparó con 10mg de  $\alpha$ -ciano (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) en un tubo eppendorf de 1.5ml, al cual se le agregó 700  $\mu$ l de ACN, 300  $\mu$ l de agua MQ más 1  $\mu$ l de TFA y se mezcló completamente. La solución fue sonicada durante 30 min utilizando un sonicador Cole – Parmer y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- Para colocar las muestras sobre la placa o *spotear* la placa, se utilizó un volumen total de 0.68  $\mu$ l por pozo. Para esto la muestra fue previamente mezclada con la matriz en una proporción de 1:1 en un tubo de 0.2 ml. Por último, cuidadosamente se colocó la muestra en la placa por sextuplicado, sin tocar la superficie del plato con la punta para evitar la cristalización no homogénea.
- Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente hasta la evaporación total de solvente. Posterior al secado se aplicó una corriente de aire a presión sobre la placa para eliminar cualquier fibra que se haya

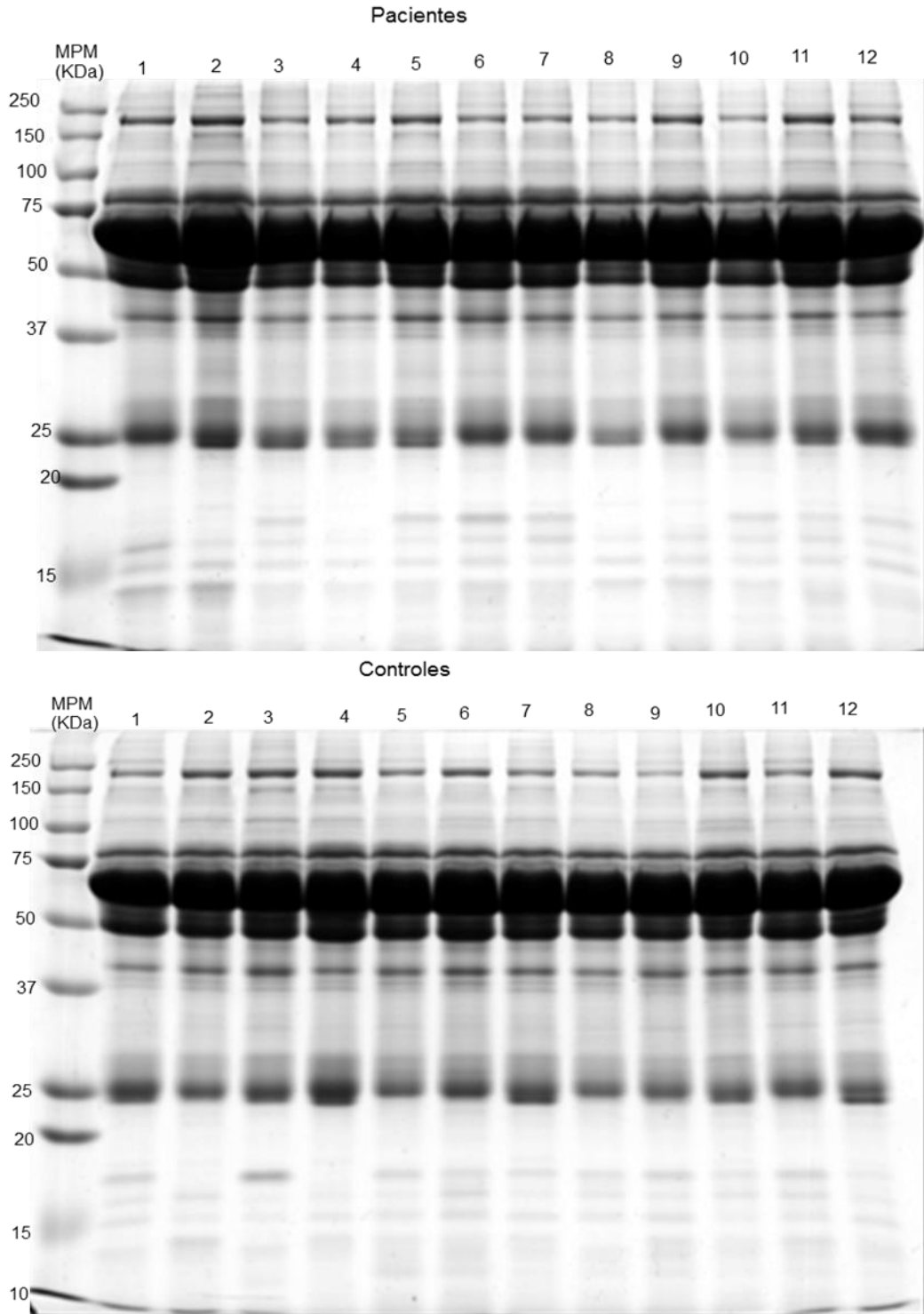
depositado sobre la superficie de la placa. Finalmente esta se colocó en el equipo MALDI TOF/TOF para su análisis.

- El equipo MALDI TOF/TOF se calibró para la lectura de MS con la solución Cal Mix 4700 (AB-SCIEX TOF/TOF™ Instruments), en el rango de 900-4000Da. Y para la calibración de MS/MS se utilizó el ion de Angiotensina I (m/z 1,296.68).
- Los espectros de masa y carga de los péptidos fueron analizados con el algoritmo de búsqueda Paragon utilizando el software ProteinPilot™ (AB Sciex), el cual permitió que se realizaran búsquedas de cientos de modificaciones biológicas, variaciones genéticas y sustituciones en los aminoácidos del péptido para disminuir la presencia de falsos positivos. La identificación de las proteínas en las muestras, se realizó utilizando la base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>) con un porcentaje de confianza del 66% para *Homo sapiens*. De los cuales aquí, se muestran los resultados obtenidos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Cuantificación e Integridad de las muestras*

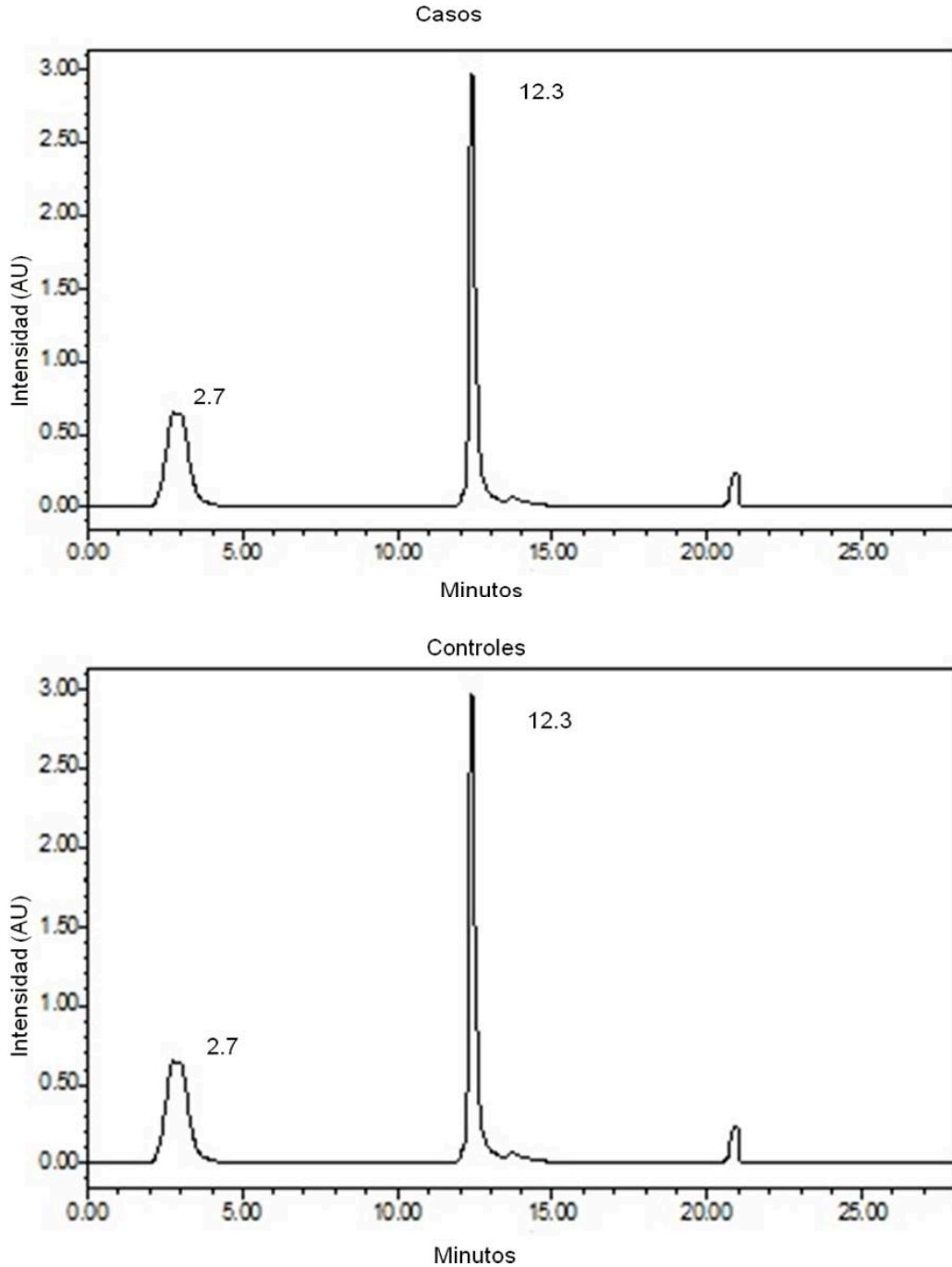
Después de cuantificar las muestras que conforman el *pool* de controles y el de pacientes mediante el kit 2D-QUANT, se realizaron geles de acrilamida al 12% para la realización de la electroforesis SDS-PAGE, al término de esta los geles fueron escaneados y se obtuvieron las siguientes figuras. En la figura 4, se observa la integridad de cada una de las muestras que integra el *pool* de pacientes y el de controles, respectivamente. Se cargó en el gel la cantidad de 20µg de proteína de cada muestra. En las imágenes son visibles una serie de bandas las cuales pertenecen a proteínas de diferente peso molecular. Las bandas más altas se observan no difuminadas, lo que indican la presencia de proteínas con alto peso molecular; en el caso de que estas se encuentren borrosas en la parte superior del gel se observa una serie de bandeo producto de la proteólisis de la muestra. Debido a que todas las muestras se observaron integras según los criterios mencionados se trabajó con las 12 muestras cuantificadas para su análisis.



**Figura 4.** Geles de acrilamida al 12% (Pacientes y Controles, respectivamente); en cada carril se cargaron 20 $\mu$ g de proteína y un marcador de peso molecular (MPM). La integridad de los *pooles* se observó en la presencia de bandas de alto peso molecular no difuminadas, que significa que la muestra no está degradada. Asimismo se observa que gran parte de la cantidad de proteína es ocupada por la cadena pesada de las Inmunoglobulinas G (IgG) que corresponden a un masa aproximada de 55 KDa y a la albúmina con masa de 69KDa

## **6.1 Enriquecimiento de las proteínas minoritarias de las muestras por cromatografía líquida de alta eficacia. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).**

Las proteínas que no quedaron adheridas a la columna, que corresponden a las proteínas que se encuentran en menor abundancia en el proteoma y constituyen el primer pico cromatográfico, se observan en la figura 5. A continuación, las proteínas que sí quedaron retenidas se eluyeron y en el cromatograma, corresponden al segundo pico. Esta separación, también se observa en el tiempo de retención de cada fracción, siendo de 2.7 minutos para las proteínas que no son retenidas y de 12.3 minutos para aquellas que tienen afinidad con los anticuerpos de la columna.



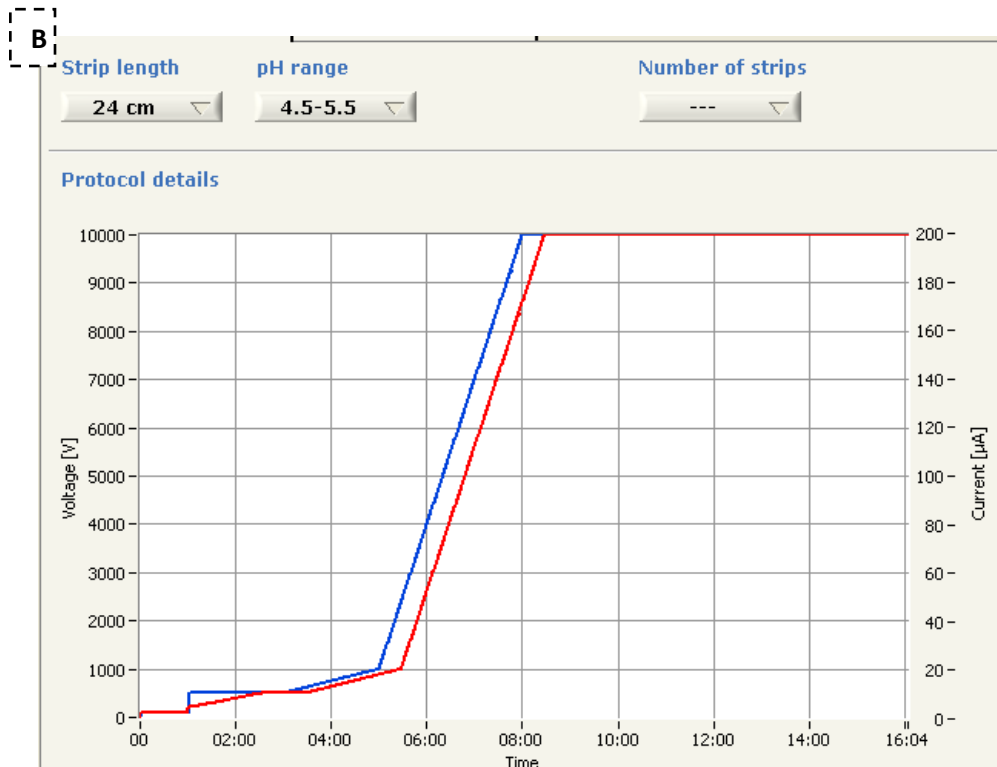
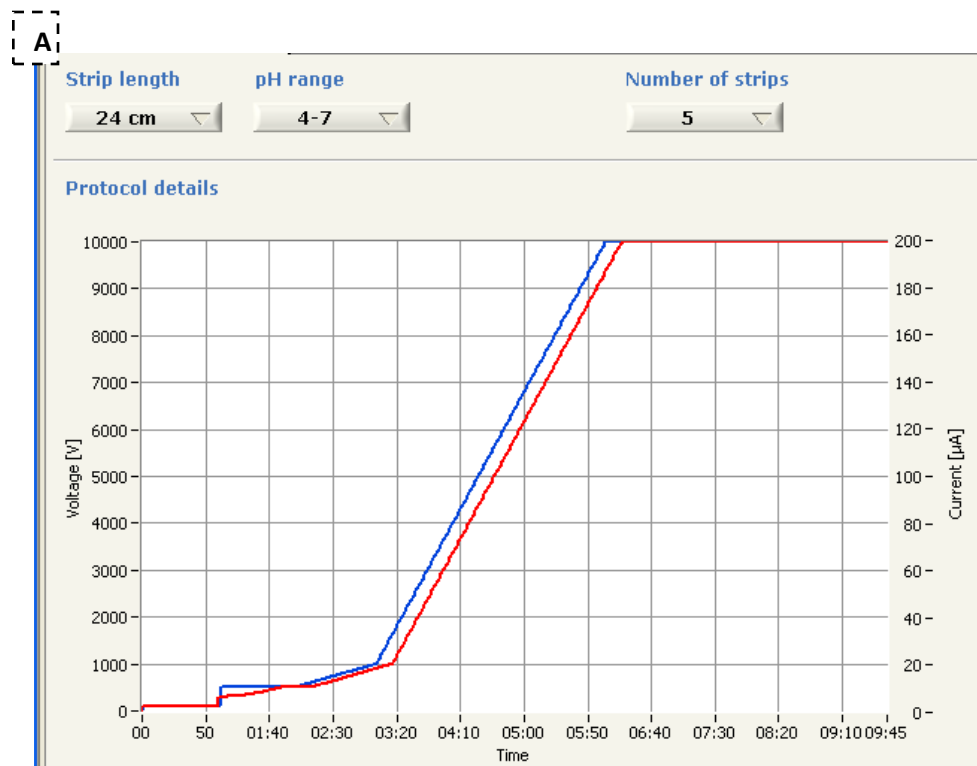
**Figura 5.** Cromatograma del enriquecimiento del *pool* de controles y casos. Se utilizó el sistema de Multiple Affinity Removal Column 4.6mm x 100mm, el cual contiene anticuerpos inmovilizados de las seis proteínas más abundantes en plasma. El tiempo de retención para las proteínas de menor abundancia fue de 2.7 minutos (primer pico) y de 12.3 para las proteínas mayoritarias: albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina y antitripsina (segundo pico).

## **6.2 Geles de electroforesis diferencial. *Difference Gel Electrophoresis* (DIGE)**

Los geles de electroforesis diferencial, separan a las proteínas en dos dimensiones, la primera en relación a su punto isoeléctrico (pI) por medio de la realización del isoelectroenfoque (IEF), y la segunda con base a su peso molecular, por medio de una electroforesis. El pI de una proteína es el pH en el cual la proteína presenta carga cero, esto debido a que los aminoácidos, que conforman a las proteínas, presentan grupos ácidos (carboxilos) y grupos alcalinos (aminos) que otorgan a los aminoácidos propiedades de ácido o base y por ende una carga. Por lo tanto bajo la influencia de un campo eléctrico, durante el isoelectroenfoque, las proteína migraron hasta encontrar la posición donde su carga neta fue cero y de esta manera se permite la separación de las proteínas en base a su pI (Ünlü *et al.*, 1997).

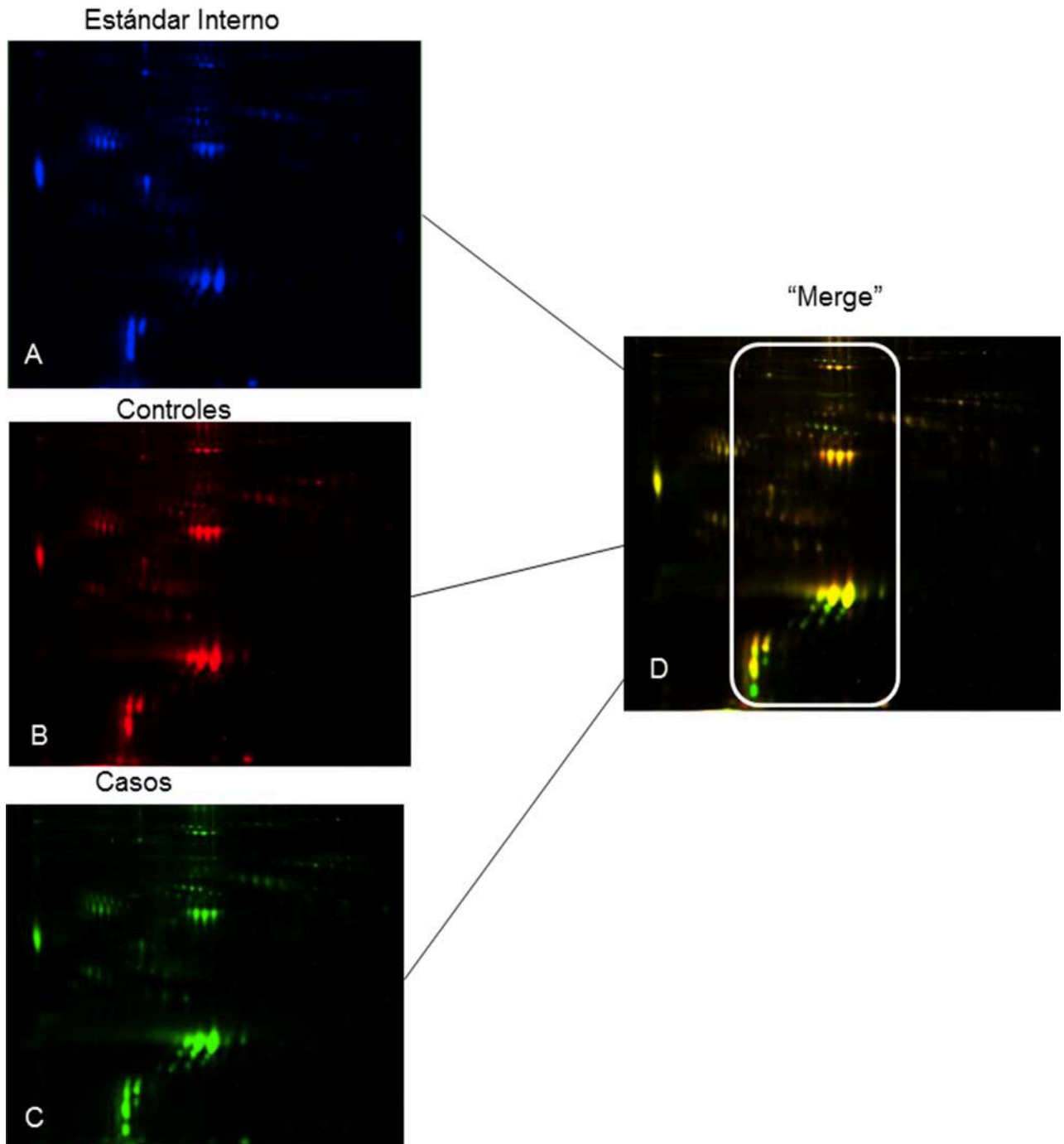
En la figura 6, se observa el IEF de las muestras procesadas en condiciones desnaturalizantes de ambas tiras, en donde se observa que ambas muestras no contiene sales ya que no existe resistencia en la corrida real (línea roja) y esta se ajusta a la corrida teórica (línea azul).





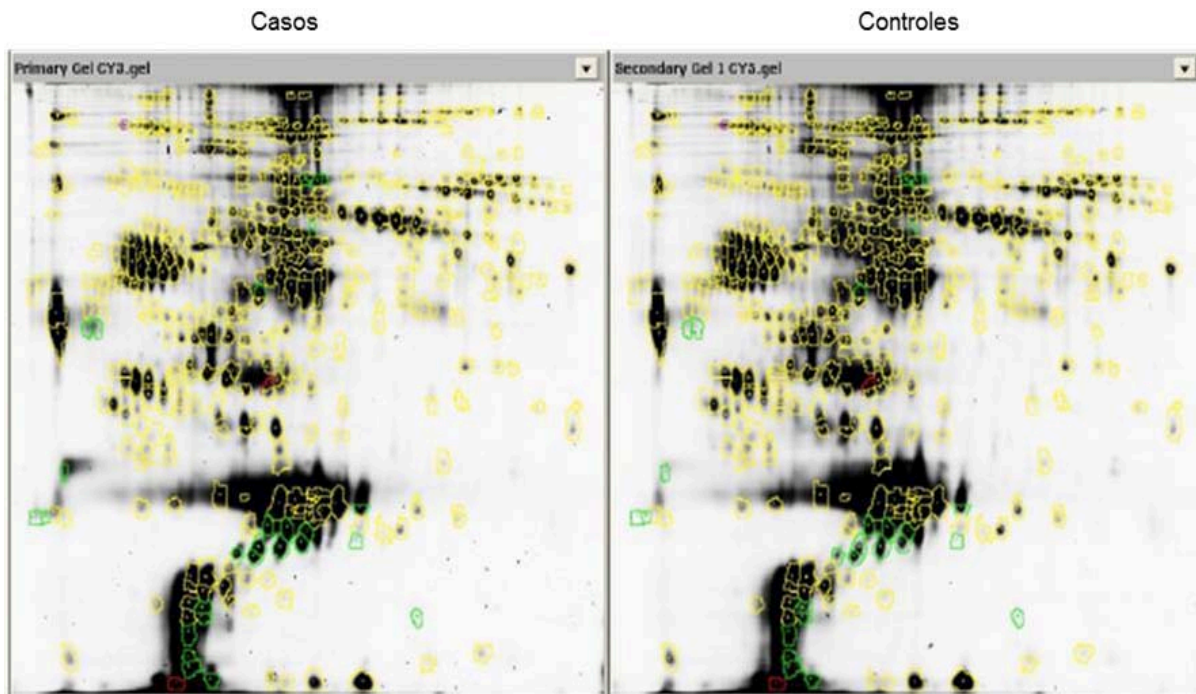
**Figura 6. A)** Isoelectroenfoco (IEF) de tira de acrilamida de 24cm, con rango de pH 4-7. **B)** Isoelectroenfoco (IEF) de tira de acrilamida de 24cm, con rango de pH 4.5-5.5. Se observa el IEF teórico (línea azul) y la corrida real del IEF (línea roja), la gráfica muestra que las proteínas se ajustan a la corrida teórica, lo que significa que las muestras no contienen exceso de sales que interfieren con la corrida del IEF.

Al concluir el tiempo, se realizó la adquisición de las imágenes del gel con el escáner Ettan DIGE Imager, según las condiciones descritas en la tabla 6. En la figura 7, se puede observar las imágenes obtenidas de cada grupo marcado por un fluorocromo independiente y con la realización del “merge”, el cual es el empalme de las imágenes para su análisis de expresión, utilizando el software DeCyder 2-D Differential Analysis (GE Healthcare), que sirve para la visualización de diferencias en la expresión de proteínas entre dos grupos. Sin embargo, en la imagen se puede observar una acumulación de proteínas en el rango aproximado de pH entre 4 y 5, las cuales no se encuentran separadas por completo, por lo que se decidió realizar otro gel DIGE con un rango de pH de 4.5-5.5, para poder separar y diferenciar aquellas proteínas que se encontraron dentro de ese rango.



**Figura 7.** Imágenes y "merge" de la electroforesis DIGE de 24cm en un rango de pH 4-7. **A)** Estándar Interno (25 $\mu$ g del grupo de controles y 25 $\mu$ g del grupo de casos) fue marcado con el flúoróforo Cy2, **B)** Grupo control (50  $\mu$ g) se marcó con Cy5, **C)** Grupo de casos (50  $\mu$ g) marcados con Cy3 y **D)** "Merge" (sobreposición de las imágenes para crear una única imagen). Se puede observar que existe una afinidad mayor de las proteínas hacia un pH aproximado de 4-6.

El análisis diferencial de este gel se realizó con respecto al grupo de controles, en donde se observa un total de 492 *spots* identificados con su abundancia relativa, 2 *spots* (0.4%) que disminuyen su expresión más de 2 veces, 30 *spots* (6.1%) que aumentan su expresión más de 2 veces y 460 *spots* similares que corresponden a un 93.5% del total de *spots* (figura 8).

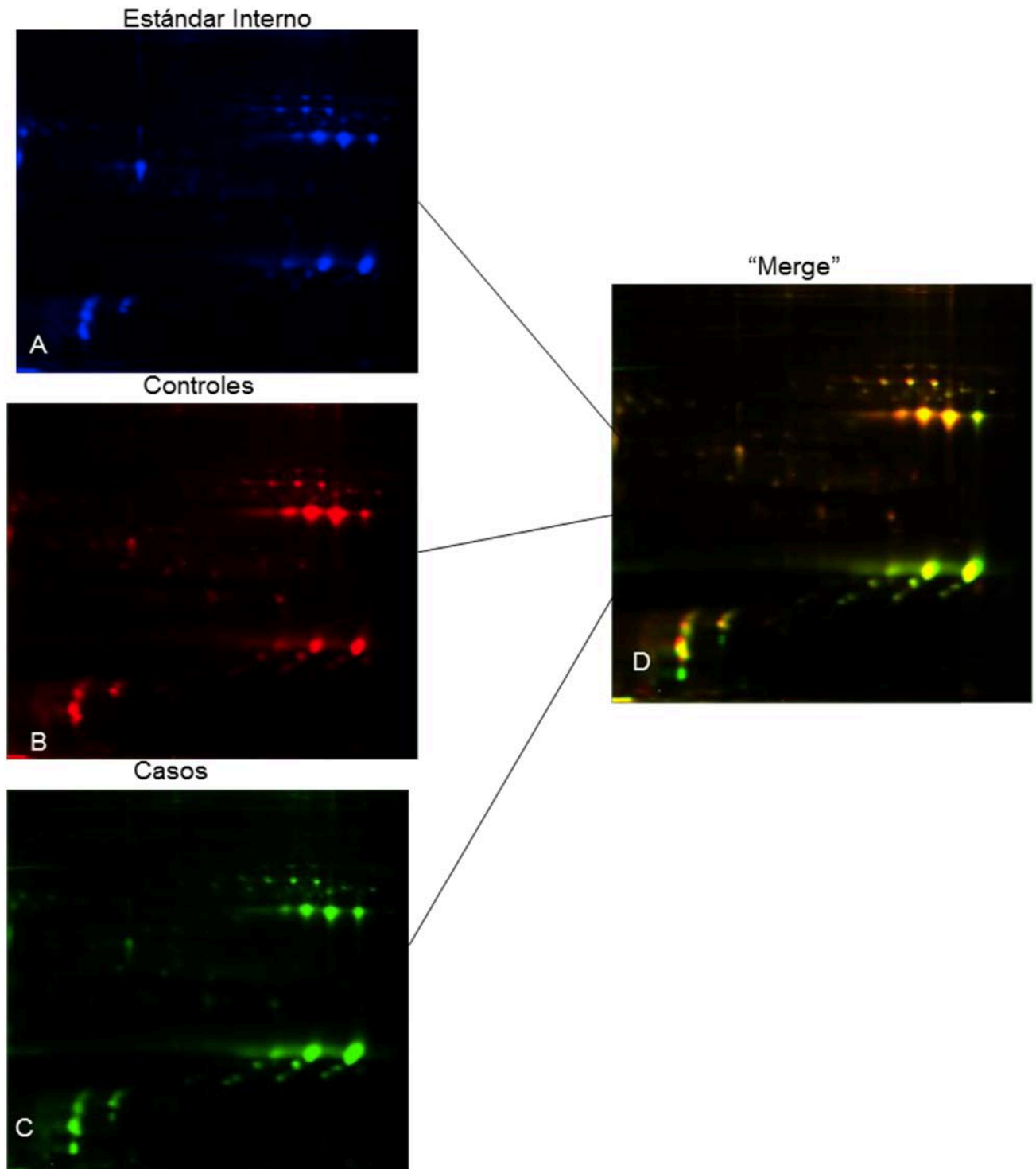


**Figura 8.** Análisis diferencial del gel DIGE de 24cm con un rango de pH 4-7. Los *spots* marcados en amarillo indican que no hay cambios de expresión de la proteína entre casos y controles. El color verde, indica que las proteínas disminuyen 2 o más veces su expresión y finalmente el color rojo indica proteínas que aumentan 2 o más veces su expresión, ambas con respecto a los grupo control.

#### *Geles de electroforesis diferencial pH 4.5-5.*

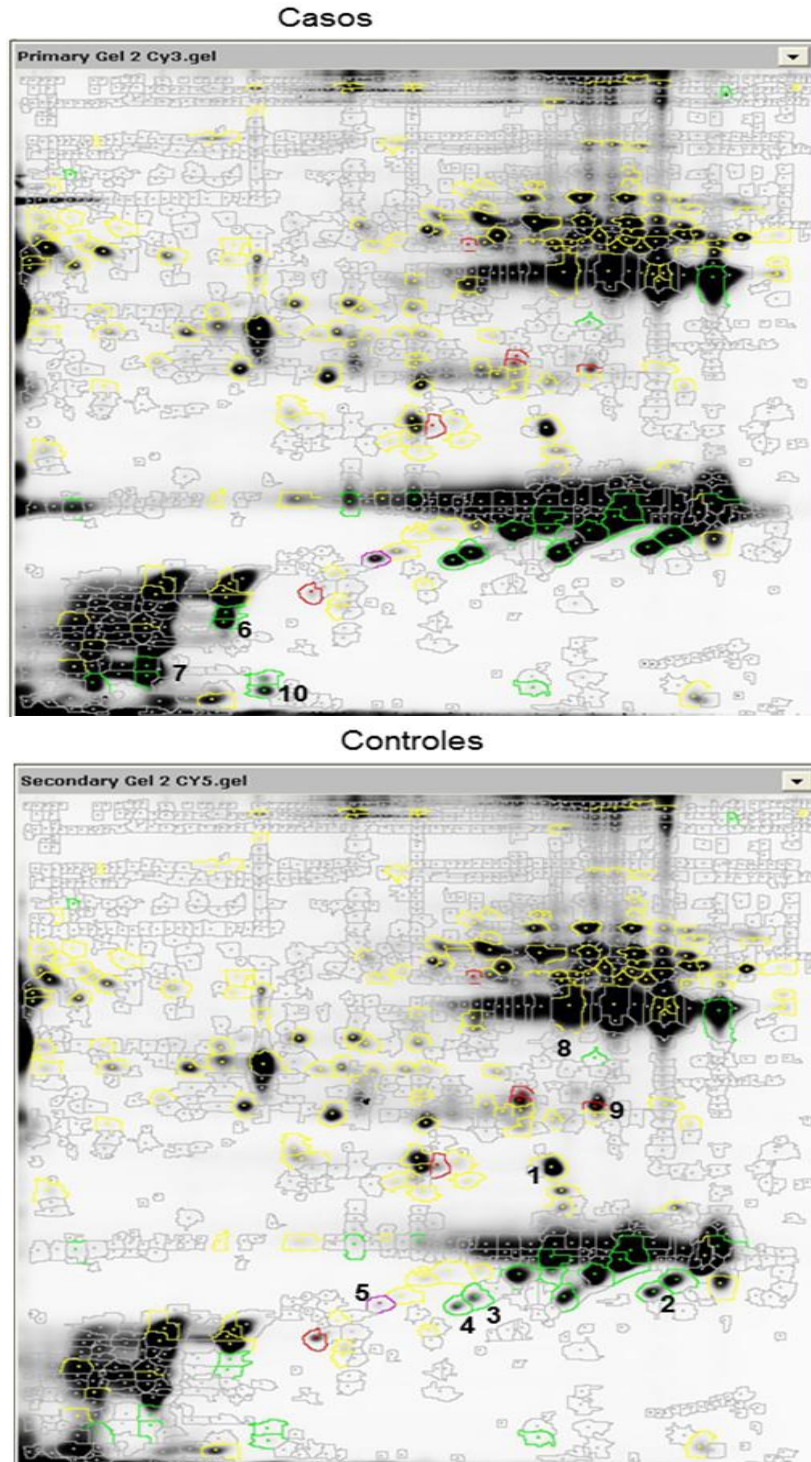
Debido a que el objetivo de estos métodos es la separación de las proteínas para así optimizar la identificación de las mismas, y puesto que se observó una gran acumulación de ellas en el centro del gel, se tomó la decisión de realizar un gel de 24cm con rango de pH de 4.5-5.5. Por lo que se realizó siguiendo el mismo protocolo.

En la figura 9, se observa un patrón diferencial de expresión de los *spots*, tanto en su tamaño como en su color, esto debido a que si un grupo de proteínas se encuentran presentes solo en el grupo control (Cy5) el *spot* se observa más cercano al color rojo y si se encuentra el *spot* presente solo para el grupo de casos se observa el *spot* con tonalidades verdes (Cy3). De esta manera obtenemos su abundancia relativa de los *spots* identificados con diferencias en su expresión, que pueden ser posibles biomarcadores y proteínas de interés.



**Figura 9.** Imágenes y “merge” de la electroforesis DIGE de 24cm en un rango de pH de 4.5-5.5. **A)** Estándar Interno (25µg del grupo de controles y 25µg del grupo de casos) fue marcado con el fluróforo Cy2, **B)** Grupo control (50 µg) se marcó con Cy5, **C)** Grupo de casos (50 µg) marcados con Cy3 y **D)** “Merge” (sobreposición de las imágenes para crear una única imagen). Los *spots* de color verde son proteínas expresadas solo en casos y las de color rojo son proteínas exclusivas de los controles.

En la figura 10, se observa el análisis de expresión diferencial de los *spots* identificados por el software DeCyder 2-D Differential Analysis (GE Healthcare), el cual logró identificar en el gel un total de 199 *spots*, de los cuales 165 *spots* (82.8%) son similares en su expresión, 28 *spots* (14.1%) presentan un incremento en su expresión de más de dos veces y 6 *spots* (3.0%) disminuyen su expresión dos o más veces con respecto a los controles.



**Figura 10.** Análisis comparativo de expresión del gel DIGE de 24cm con un rango de pH 4.5-5.5. El color amarillo indica que no existe diferencia en la expresión de proteína entre el grupo de casos y controles. El color verde, que las proteínas disminuyen 2 o más veces su expresión y finalmente el color rojo indica proteínas que aumentan 2 o más veces su expresión, ambas con respecto a los grupo de casos. Las proteína enumeradas del 1-10, son aquellas que se cortaron e identificaron mediante espectrometría de masas.



La realización de este gel en el rango de pH 4.5-5.5, permitió mejorar la resolución espacial de los *spots* que se encontraban demasiado cercanos entre sí. De los *spots* en los que se observó un incremento de su expresión en el grupo de pacientes, se eligieron 10 de ellos (figura 10), que fueron cortados con una punta de micropipeta según el tamaño del *spot*, y procesados e identificadas las proteínas de cada uno de ellos.

### 6.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

En la tabla 8, se observan los 10 *spots* que se cortaron y procesaron a partir del gel DIGE, con sus respectivas proteínas que se lograron identificar por medio del software ProteinPilot™ (AB Sciex), además en la tabla, se observa su contribución y porcentaje de cobertura de cada una de ellas dentro del *spot*. En total, se lograron identificar 6 diferentes proteínas humanas, diferencialmente expresadas entre casos y controles, es decir, se observó un incremento en la expresión de ciertas proteínas en el grupo de pacientes, esto sugiere que pertenecen e interactúan en la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno, las cuales se presentan en la tabla 9, cada una de ellas se muestra con el nombre del gen que la codifica.

#de Spot	# de Acceso	Nombre de la proteína	%Cobertura de la proteína
1	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8
	C9J6P4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZC3HAV1 PE=2 SV=1	1.9
2	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8
3	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8
4	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8

		sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	
	E9PQ63	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=2 SV=1	11,8
<b>5</b>	C9J6P4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZC3HAV1 PE=2 SV=1	1.9
<b>6</b>	Q8IVZ3	OSBPL1A protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	20
	AON4V7	HCG2039797 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=Tcr-alpha PE=4 SV=1	38.1
<b>8</b>	Q96GE1	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5.3
	Q8IVZ3	OSBPL1A protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	20
<b>9</b>	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8
	Q86YR6	POTE ankyrin domain family member D OS=Homo sapiens GN=POTED PE=2 SV=2	2,9
<b>10</b>	Q86W17	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	23.8

**Tabla 8.** Listado de proteínas identificadas en los 10 *spots* analizados por el software ProteínPilot con un porcentaje de confianza de 66%. Se observa el número de acceso de la proteína que es utilizado en la base de datos UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), el nombre de la proteína, la contribución de la proteína y por último el porcentaje de cobertura de identificación del péptido.

#de Acceso	Nombre de la proteína	Nombre del gen
<b>Q86W17</b>	Protease serine 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=4 SV=1	PRSS1
<b>E9PQ63</b>	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens GN=CBR1 PE=2 SV=1	CBR1

<b>Q8IVZ3</b>	OSBPL1A protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	N/A
<b>Q96GE1</b>	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	N/A
<b>Q86YR6</b>	POTE ankyrin domain family member D OS=Homo sapiens GN=POTED PE=2 SV=2	POTED
<b>A0N4V7</b>	HCG2039797 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=Tcr-alpha PE=4 SV=1	Tcr-alpha
<b>C9J6P4</b>	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZC3HAV1 PE=2 SV=1	ZC3HAV1

**Tabla 9.** Listado de las 7 diferentes proteínas que se identificaron por medio de espectrometría de masas, se muestra el número de acceso a la base de datos uniprot, su nombre completo de la proteína y el nombre de su gen.

Las 6 proteínas sobreexpresadas en pacientes, solo pertenecen a la especie humana y son descritas posteriormente, ya que el análisis de los *spots*, arrojó la identificación de ciertas proteínas pertenecientes a organismos patógenos, esto debido a la semejanza de masa y carga que puede existir en los péptidos que conforman a la proteína, aunque estos sean de distintas especies; dicho análisis es realizado mediante espectrometría de masas en base las características mencionadas anteriormente, así como, en el patrón de fragmentación del péptido. (Martín y Ballesteros, 2010).

Dentro de las proteínas humanas identificadas, se encuentra una serin proteasa que presenta una longitud de 84 aminoácidos y su masa de 9.2 KDa, la cual es codificada por el gen **PRSS1**, este gen codifica una gran variedad de tripsinógenos, enzimas que son secretadas por el páncreas y por tanto se encuentran en el espacio extracelular, las podemos encontrar en su forma activa en el intestino delgado ya que interactúan con enlaces peptídicos relacionados con el grupo carboxilo de lisina o arginina. Se ha reportado que polimorfismos en este

gen se encuentran muy asociados a pancreatitis, y además de que algunos otros tripsinógenos se han encontrado localizados en los receptores beta de la células T, (Chandak *et al.*, 2002).

La proteína identificada como carbonil reductasa, tiene una longitud de 178 residuos con una masa de 19.02KDa, codificada por el gen **CBR1**, se ha reportado su expresión en órganos como el duodeno e intestino delgado. Pertenece a la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, las proteínas de esta familia funcionan como oxidorreductasas dependientes de NADPH con una amplia especificidad para distintos sustratos de carbonilo, tales como quinonas, prostaglandinas y diversos xenobióticos. Además este gen es blanco de estudio de la farmacogenómica ya que está asociado con la reducción de componentes cardiotoxicos del doxorubicinol. (Miura *et al.*, 2013).

Siguiendo el listado de proteínas identificadas se encuentra la proteína **OSBPL1A** (oxysterol binding protein-like 1A), la cual es una proteína que se ha observado su expresión en suero, tiene una longitud de 100 residuos, le corresponde una masa de 11.196 KDa. y es un miembro de la familia de unión a los oxisteroles, un grupo de receptores de lípidos intracelulares. La mayoría de los miembros contiene un dominio altamente conservado en el carboxilo terminal de unión al esterol; los cuales tienen como función la unión de fosfolípidos. De igual manera, se ha reportado que estabiliza la unión de GTP con RAB7A (Ras-related protein Rab-7A) la cual es una proteína clave en el transporte endocítico, ya a que juega un papel importante en la supervivencia de bacterias patógenas como *Salmonella*, así como en la participación de algunos virus en su ciclo replicativo (Tai *et al.*, 2011).

De igual manera se identificó una posible proteína no caracterizada (**Putative uncharacterized protein (Fragment)**), caracterizada por Strausberg R. en el año 2001, presenta una longitud de 207 aminoácidos y su masa de 22.47KDa, es una proteína que está relacionada con la familia de proteínas intermediarias filamentosas, las cuales son el primordial componente del citoesqueleto y

envoltura nuclear. Dichas proteínas, generalmente forman estructuras filamentosas de 8 a 14nm de diámetro.

Asimismo se identificó la proteína **POTE** ankyrin domain family member D, que tiene una longitud de 584 aminoácidos y una masa de 66.394KDa. Es codificada por el gen POTED y se expresa en tejidos tales como próstata, ovario, testículo y placenta. Además se ha observado su expresión en distintas líneas celulares de cáncer de próstata, específicamente en la membrana celular de las mismas (Bera *et al.*, 2012).

Dentro de las proteínas identificadas se encuentra un fragmento de la proteína **HCG2039797**, la cual es una **proteína hipotética**. De acuerdo a Venter y cols. en el 2001 a partir del análisis de la secuencia del genoma humano, se tradujo un fragmento de DNA del cual se ha predicho esta proteína, así como su secuencia de residuos, la cual se encuentra registrada en la base de datos de UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) con una longitud de 21 aminoácidos y su masa de 2.214 KDa. Sin embargo, aún no existe evidencia experimental reportada para la estructura de esta proteína. No obstante, dicha proteína es codificada por el gen Tcr-alpha (*T cell receptor*) que codifica para un receptor de linfocitos T con actividad enzimática, que presenta como ligando a péptidos pequeños asociados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC por sus siglas en inglés; el complejo se compone de conjuntos de proteínas encargados de reconocer y diferenciar en el organismo lo propio de lo extraño, es decir presentar antígenos para activar cascadas de señalización para iniciar la respuesta inmune. Estos receptores se encuentran en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Las primeras son células del sistema inmune las cuales en su forma inmadura se encuentran circundantes en los capilares sanguíneos hasta su maduración, la cual se lleva a cabo por la respuesta de ciertos factores de crecimiento y citocinas como la interleucina 3 (IL-3). Las segundas constituyen una amplia gama de células, las cuales juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune adaptativa, que incluye la inmunidad celular mediada por macrófagos y linfocitos T, así como la activación

de la respuesta humoral por estímulo de linfocitos B y la producción de anticuerpos. De este modo su activación por un estímulo externo se encuentra asociado al reconocimiento de patrones moleculares de patógenos (Kindt *et al.*, 2009). Ensayos funcionales que se realizaron en ratones homocigotos infectados con el virus de Influenza de los cuales se extrajeron y cultivaron células linfocitos T infectados, demostraron que los ratones que expresaron en ellas receptores de este tipo responden apropiadamente a la infección, es decir que estos receptores se encuentran estrechamente relacionados con el MHC y por ende a la respuesta inmune del hospedero. (Eilcherberg *et al.*, 1995). De igual manera se ha propuesto la transferencia de estos receptores como terapia en modelos de ratones, ya que la especificidad de antígeno de la células T, está mediada por las cadenas alfa y beta de los receptores de este tipo, en consecuencia esta terapia puede ser una estrategia muy atractiva con la cual se puede imponer cierta especificidad por algún virus o antígeno tumoral (Kessels *et al.*, 2001).

Por último, en la lista se encuentra la proteína antiviral **ZC3HAV1** (*Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1*) que tiene una longitud de 1072 residuos y corresponden a una masa de 114.085KDa y es codificada por el gen homónimo. Esta proteína pertenece al dominio de las proteínas de dedos de zinc, las cuales son pequeños motivos estructurales, es decir múltiples alineamientos de regiones conocidas o estructuras secundarias proteicas, las cuales operan como elementos funcionales y pueden coordinar uno o más iones de zinc para estabilizar sus pliegues (Acosta-Viana, 1996). El *splicing* alternativo genera 4 isoformas de esta proteína. De las cuales, cabe mencionar que la isoforma 1 es un inhibidor viral más potente que la isoforma 2. Sin embargo, la isoforma 2 actúa como regulador positivo de la señalización de DDX58/RIG-I, los cuales son genes importantes en la respuesta inmune del hospedero, esto resulta en la activación río abajo de IRF3 que conduce a la expresión de distintos tipos de interferón, principalmente del tipo I (IFN-I) para combatir la infección viral. Este dominio de proteínas ha demostrado tener acción inhibitoria contra distintas familias de virus de ARN, tales como *Retroviridae*, *Filoviridae* y *Togaviridae* (Hayakawa *et al.*, 2011).

**ZC3HAV1** promueve la degradación del RNA mensajero (ARNm) viral, mediante el reclutamiento de diversos mecanismos, tales como la ribonucleasa PARN (*poly(A)-specific ribonuclease*) para eliminar la cola poli A y reclutar el complejo de exoribonucleasa 3'-5' del exosoma que degrada el RNA desde el extremo 3'. De igual manera se recluta el complejo DCP1-DCP2 (*decapping*) a través de la ARN helicasa p72 (DDX17) para eliminar la caperuza del ARNm viral, el cual inicia con la degradación por el extremo 5'. Esto ha sido observado tanto en líneas celulares de ratón como de humano, en donde los niveles de expresión de ZC3HAV1 muestran una relación dependiente con la infección del virus de manera que la depleción de la proteína endógena antiviral aumenta la infección por el virus. Esto se ha demostrado para virus HIV-1 y virus MLV (*murine leukemia virus*) (Zhu *et al.*, 2011). En particular la proteína **ZC3HAV1** es un miembro de la familia de proteínas PRR que marca y elimina virus de ARN, independientemente de miembros de los TLR (*Toll-like receptor*) y miembros de la familia RLR (*Receptor like retinoic*) que también se encuentran asociados la respuesta antiviral e inducen la producción de IFN-I (Hayakawa *et al.*, 2011 y Hanna *et al.*, 2013).

Es sabido que **ZC3HAV1**, tiene actividad antiviral contra diversos virus de ARN en ensayos con cultivos celulares. Sin embargo, aún no se conoce por completo la interacción que tiene la proteína con la activación y regulación de otros genes y sus vías, así como las secuencias de reconocimiento del ARN viral del virus Influenza A H1N1(pdm09) e interacciones que ocurren con estos motivos estructurales para la regulación del ARNm viral como mecanismo en la respuesta inmune que induce la desestabilización del ARN viral por medio de la maquinaria de degradación de la célula. Para esto, son requeridos estudios para la caracterización fisicoquímica de la proteína, así como estudios funcionales que satisfagan estos objetivos.

## 7. CONCLUSIONES

- En el análisis DECYDER (GE, Healthcare), se logró identificar en el gel de pH de 4.5-5.5, un total de 199 *spots*, 6 de ellos (3.0%) disminuyen su expresión más de dos veces, 28 *spots* (14.1%) aumentan su expresión en más de dos veces y 165 *spots* (82.8%) no muestran diferencias en su expresión.
- De los 10 *spots* que fueron seleccionados en el gel DIGE (Difference Gel Electrophoresis), el análisis con el software ProteinPilot (AB Sciex), identificó las siguientes proteínas sobreexpresadas en pacientes: PRSS1, POTED, CBR1, OSBPLA1, Tcr-alpha, ZC3HAV1
- De las proteínas encontradas como posibles candidatos a estudios para biomarcadores proteicos o futuros blancos terapéuticos, se encuentra la proteína antiviral **ZC3HAV1**, que juega un papel importante en la degradación del ARN viral dentro del citoplasma.

## 8. PERSPECTIVAS

Se propone la realización de geles de electroforesis bidimensional incrementando la cantidad de proteína de las muestras, esto con el fin de hacer más robusto la identificación de las proteínas mediante el método de espectrometría de masas. Además, como ya se mencionó anteriormente, en la búsqueda de biomarcadores el último paso del protocolo es la validación de las proteínas de interés; para cumplir con este objetivo existen técnicas como ensayos de Western Blot, ELISA e inmunohistoquímicas, en las cuales se utilizan anticuerpos específicos para el reconocimiento de la proteína, la cual es posible observar a partir de una técnica de revelado. Asimismo, existe la posibilidad de realizar la validación y cuantificación de proteínas empleando los distintos espectrómetros de masas, sin la necesidad de utilizar técnicas de marcaje o el diseño de anticuerpos específicos; esto se logra utilizando herramientas como el Orbitrap (Thermo Scientific), aprovechando la alta eficiencia y reproducibilidad de la cromatografía



líquida junto con la sensibilidad y especificidad del acoplamiento de un espectrómetro de masas. Para continuar con el proyecto de igual manera se propone ensamblar un protocolo, el cual se encuentre orientado a la caracterización y el estudio de los procesos funcionales e interacciones de la proteína identificada con actividad antiviral.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Viana, K. Y., & Zavala-Castro, J. E. 1996. Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed*, 1(7), 163-172pp.
- Anderson, N. L. y Anderson, N.G. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 11(19): 1853-1861pp.
- Anderson, N.L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R.S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Adkins, J.N., Pounds, J.G. Fagan, R. y Lobley, A. 2004. The human plasma proteome. *Mol Cell Proteomics*. 4(3): 311-326pp.
- Bastien, N., Antonishyn, N.A., Brandt, K., Wong, C.E., Chokani, K., Vegh, N., Horsman, G.B., Tyler, S., Graham, M.R., Plummer, F.A., Levett, P.N. y Li, Y. 2010. Human Infection with a Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1N1) Virus Containing the Hemagglutinin and Neuraminidase Genes of Seasonal Influenza Virus. *J Infect Dis*. 1(201): 1178-1182pp.
- Bautista, E., Arcos, M., Jimenez-Alvarez, L., García-Sancho, M.C., Vázquez, M.E., Peña, E., Higuera, A., Ramírez, G., Fernández-Plata, R., Cruz-Lagunas, A., García-Moreno, S.A., Urrea, F., Ramírez, R., Correa-Rotter, R., Pérez-Padilla, R. y Zúñiga, J. 2013. Angiogenic and inflammatory markers in acute respiratory distress syndrome and renal injury associated to A/H1N1 virus infection. *Exp Mol Pathol*. 3(94): 486-492pp.
- Bera, T. K., Walker, D. A., Sherins, R. J., & Pastan, I. (2012). POTE protein, a cancer-testis antigen, is highly expressed in spermatids in human testis and is associated with apoptotic cells. *Biochem Bioph Res Co*. 417(4), 1271-1274pp.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades: <http://www.cdc.gov>. Citado en Febrero 2015
- Chandak, G. R., Idris, M. M., Reddy, D. N., Bhaskar, S., Sriram, P. V. J., & Singh, L. 2002. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J Med Genet*. 39(5), 347-351pp.

- Dardé, V. M., Barderas, M. G., De la Cuesta, F., Durán, M. C., Egido, J., y Vivanco, F. 2006. La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma facilita su análisis proteómico en pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación cardiovascular*. 1(9): 37-54pp.
- Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B. y Uyeki, T.M. 2009. Emergence of a novel swineorigin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal Medic*. 1(360): 2605-2615pp
- Eichelberger, M., McMickle, A., Blackman, M., Mombaerts, P., Tonegawa, S., & Doherty, P. C. (1995). Functional analysis of the TCR alpha-beta+ cells that accumulate in the pneumonic lung of influenza virus-infected TCR-alpha-/- mice. *J Immunol*. 154(4): 1569-1576pp.
- González-Buitrago, M.J., Ferreira, L. y Muñiz, M.C. 2008. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med Clin*. 11(131): 426-434pp.
- Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., Mizutani, T., Kazumata, M., Sato, M., Tanaka J., Asaka, M., Ohba, Y., Miyazaki, T., Imamura, M. y Takaoka, A. 2011. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nature immunology*. 12(1): 37-44pp.
- Issaq, H.J., Veenstra, T.D., Conrads, T.P. y Felschow, D. 2002. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Bioph Res Co*. 3(292): 587-592pp.
- Kawai, T. y Akira, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition ARTICLE. *Int Immunol*. 21(4): 317-337pp.
- Kessels, H. W., Wolkers, M. C., van den Boom, M. D., van den Valk, M. A., y Schumacher, T. N. 2001. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nature immunology*. 2(10): 957-961pp.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., y Osborne, B. A. (2007). Inmunología de Kubly. McGraw-Hill. 6ª Edición. 223-241pp.

- Koulder, N., Hadzovic-Cengic, M., Gojak, R., Hadzic, A. y Lukovac, E. 2011. Clinical and Epidemiological Characteristics of Novel AH1N1 Flu. *Medical Archives*. 651(1):13-15pp.
- LaBaer, J. 2005. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *Journal of proteome research*. 4(4):1053-1059pp.
- Lee, H., Komano, J., Saitoh, Y., Yamaoka, S., Kozaki, T., Misawa, T., Takahama, M., Satoh, T., Takeuchi, O., Yamamoto, N., Matura, Y. y Akira, S. 2013. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *P Natl Acad Sci*. 110(30):12379-12384pp.
- Liu, L., Zhou, J., Wang, Y., Mason, R.J., Funk, C.J. y Du, Y. 2012. Proteome alterations in primary human alveolar macrophages in response to influenza A virus infection. *Journal of proteome research*. 8 (11):4091-4101pp.
- Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L, Jameson J.L., y Loscalzo J. 2012. Harrison principios de medicina. 18ª Edición, Mc Graw Hill. 1485-1493pp.
- Marouga, R., Stephen, D., y Edward, H. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 3 (383):669-678pp.
- Martín Gómez, M.C. y Ballesteros, González M. 2010. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 113-168pp.
- Miura, T., Nishinaka, T., & Terada, T. (2008). Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol Cell Biochem*. 315(1-2):113-121pp.
- Neumann, G., Takeshi, N. y Yoshihiro, K. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 459(7249):931-939pp.
- Reina, J. 2002. Factors affecting the virulence and pathogenicity of avian and human viral strains (influenza virus type A). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20(7):346-353pp.
- Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. 2014. *Documento Técnico de Influenza*. [En línea] (Actualizado al 05 de Febrero de 2014). Disponible en:

[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/influenza/documento\\_tecnico\\_influenza.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/influenza/documento_tecnico_influenza.pdf)

- Secretaría de Salud – CeNSIA, 2015 <http://www.censia.salud.gob.mx/>
- Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S., Cheun, C., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S., Guan, Y. y Rambaut, A. 2009 Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 7250(459):1122-1125pp.
- Strausberg, R. 2001. to the EMBL/GenBank/DDBJ databases (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q96GE1>)
- Stroink, T., Ortiz, M.C., Bult, A., Lingeman, H., de Jong, G.J., Underberg, W.J. 2005. On-line multidimensional liquid chromatography and capillary electrophoresis systems for peptides and proteins. *J Chromatogr B*. 1(817):49-66pp.
- Tai, A. W., Benita, Y., Peng, L. F., Kim, S. S., Sakamoto, N., Xavier, R. J. y Chung, R. T. 2009. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell host & microbe*. 5(3):298-307pp.
- Talledo, M. y Zumaeta, K. 2009. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Revista Peruana de Biología*. 16(2):227-238pp.
- Unlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S. 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 11(18):2071-2077pp.
- World Health Organization. 2012. Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire. 24(87):233-240pp. Disponible en: <http://www.who.int/wer/2012/wer8724.pdf>
- Zhao, H., Yang, J., Li, K., Ding, X., Lin, R., Ma, Y., Liu, J., Zhong, Z., Qian, X., Bo, X., Zhou, Z. y Wang, S. 2013. Proteomic analysis at the subcellular level for host targets against influenza A virus (H1N1). *Antivir Res*. 3(100):673-687pp.
- Zhou, N.N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S., Webster, R.G. 1999. Genetic reassortment of

avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol.* 10(73):8851-8856pp.

- Zúñiga, J., Torres, M., Romo, J., Torres, D., Jiménez, L., Ramírez, G., Cruz, A., Espinosa, E., Herrera, T., Buendía, I., Ramírez-Venegas, A., González, Y., Bobadilla, K., Hernández, F., García, J., Quiñones-Falconi, F., Sada, E., Manjarrez, M.E., Cabello, C., Kawa, S., Zlotnik, A., Pardo, A., Selman, M. 2011. Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City. *Autoimmunity.* 7(44):562-570pp.