



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de las diferencias entre el perfil proteómico
de la corteza cerebral prefrontal dorsolateral de
individuos que murieron por suicidio y de
individuos que murieron por otras causas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MANUEL ALEJANDRO ROJO ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. NORA ANDREA GUTIÉRREZ NÁJERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019





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.

Agradecimientos académicos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó como ayudante de investigador del proyecto Clave Salud – 2015 – 2 – 261516.

Extiendo también mis más grandes agradecimientos al equipo de psiquiatras y patólogos que ayudaron con la obtención de muestras y de los datos clínicos para el desarrollo de este proyecto. A los médicos Fernando García Dolores, Roberto Mendoza Morales, Alejandra Mendoza Larios, Ernesto Díaz Otáñez y Elier González Sáenz.

A los integrantes del Laboratorio de Genómica de las Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas, del Instituto Nacional de Medicina Genómica: Dr. Humberto Nicolini Sánchez, Dra. Nora Gutiérrez Nájera, Dra. Mirna Morales Marín y a la M. en C. Ana Luisa Romero Pimentel.

A la Dra. Diana Ivette Aparicio, de la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

De la misma manera, agradezco profunda y sinceramente a los revisores de este escrito:

Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

Dra. Ángela Victoria Forero Forero

Dra. Mirna Edith Morales Marín

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante

Agradecimientos personales

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias por todo el material disponible para mi crecimiento académico, desde mi formación media superior en la gloriosa Escuela Nacional Preparatoria 5, José Vasconcelos, hasta mi formación como Biólogo en la H. Facultad de Ciencias. Disfruté, valoré y aprendí de todos y cada uno de los momentos que viví en mi paso por tus hermosas instalaciones.

A mis padres, Hilda Romero e Inocencio Rojo. ¡Vaya situación! Me he pasado horas pensando las palabras que pudieran ser suficientes para demostrar al menos una pequeña parte del agradecimiento y amor que les tengo... pero me temo que no las he encontrado y, sinceramente, no estoy seguro de que existan. De verdad valoro mucho la formación tan humana que me dieron a través de su ejemplo de humildad, apoyo desinteresado hacia los demás y amor por nuestra familia. Quiero que sepan que todos y cada uno de los pasos que doy siempre es pensando en ustedes, siempre los traigo en mis pensamientos y esa es la razón de que sonría todo el tiempo. Papitos, no me queda más que decirles mis palabras más sinceras: Los amo, mis maestros de vida.

A mis tías, Estela y Celia Rojo, por todo el apoyo brindado en los últimos 23 años. Dicen por ahí que no hay lugar como el hogar, y aun así, ustedes me han hecho sentir que tengo más de dos hogares distribuidos por la caótica CDMX. Gracias por siempre preocuparse por mi y mis papás, gracias por siempre querer hacer de este un mejor país y gracias por ser una gran fuente de inspiración para superarme cada día más, sin importar las adversidades. Las quiero mucho y me enorgullece ser parte de la vida de dos personas tan admirables como ustedes.

A mi hermano, Jorge Rojo. Gracias por exhortarme a ser una mejor versión de mi cada día, gracias por tantos momentos juntos y gracias por las diferentes lecciones de vida que me has enseñado. Te quiero mucho.

A mi prima, Daniela Martínez. Gracias por todo este tiempo en el que me haz apoyado. ¿Sabes? A veces me pongo a recordar a quién le platicaba todo lo que me maravillaba mientras estudiaba la carrera, más aún, quién me aguantaba en un viaje mientras le platicaba de los árboles que íbamos viendo, o de los descubrimientos más recientes acerca del cerebro, o cualquiera de esos temas que, yo sé, no le interesan a muchos... sin embargo, siempre estuviste ahí para escucharme. Gracias por prestar atención hasta a la más mínima cosa que tengo para contar, por sacarme siempre una sonrisa, por estar conmigo en los días buenos y en los no tan buenos y, por supuesto, gracias por esta vida juntos, te quiero mucho.

A Karina Rivas, mi mejor amiga y aliada durante casi toda la carrera. Kari, gracias por siempre estar a mi lado, por apoyarme en todo momento y por ubicarme en la realidad cuando ha sido necesario. Gracias por ser, básicamente, la mejor amiga que alguien puede tener. Ojalá el tiempo y las circunstancias nos permitan estar igual de unidos por mucho tiempo más, te adoro.

A Moisés Enríquez, por ser un amigo extremadamente leal y por siempre hablar con la verdad, por cruda que sea. Gracias también por el apoyo brindado para terminar esta tesis, no habría podido enyender mejor las cosas que con tus clases. Gracias por el apoyo que me has dado a lo largo de esta competitiva pero bella amistad.

A Karina Díaz y Said Quiroz, mis amiguitos que siempre están para hacerme reír y pasar momentos maravillosos. Gracias por estos años de amistad, por tantos cafés, tantas salidas, tantas historias, tantas pláticas profundas y por los momentos en los que nos apoyamos dentro y fuera de la carrera.

A Frida Lira, gracias por siempre subirme el ánimo, por confiar tanto en mi y por tener grandes expectativas de mi vida personal y académica, te juro que no te voy a fallar. Gracias por siempre tener algo bonito que decir, fue hermoso tenerte a mi lado durante la carrera, en especial en el Lab. Gracias por esta amistad, pulguita.

A Angélica Martínez, es increíble lo bien que te la puedes pasar con una persona, lo feliz que te puede hacer y lo mucho que alegra tu día, aunque la veas de la forma más esporádica posible. Gracias por enseñarme el apoyo entre amigos, aun cuando no se ven seguido, amiga. Te quiero mucho siempre.

A Stella Quiroz, Valentina Sandoval y Xóchitl Mendoza, gracias por tan bellos momentos en la carrera, no puedo imaginármela sin ustedes. Nunca olvidaré nuestras vivencias. Gracias especiales por su gran apoyo en momentos difíciles y por creer en mi. Las quiero mucho.

A mis compañeras de vida, Carolina García, Katia Guerrero y Jazmín Guerrero. Gracias por todos nuestros momentos juntos los últimos 12 años, han hecho mi vida maravillosa, gracias por su apoyo incondicional. Siempre amigos.

A los profesores que dejaron huella en mi formación: Norma Sánchez, Alejandro Marché, Rosaura Mayén, Horacio Bárcenas, Tanya González, Víctor Akerberg y Mirna Morales.

A la Dra. Ángela Forero, por ser mi primer mentora en mi camino, por creer en mi, por darme la oportunidad de estar en su equipo y por la bonita amistad que conservamos hasta el día de hoy.

A Jonatan Torres, por ser un gran compañero de laboratorio, sin duda, nos divertimos mucho en el desarrollo de este proyecto y la pasamos bien en los congresos a los que asistimos

A Ana Luisa Romero, por ser una guía en este camino y por siempre compartir el conocimiento conmigo y mis compañeros de la forma más desinteresada. Gracias por defendernos y por siempre preocuparte por hacernos crecer académicamente, estoy seguro que triunfarás a donde quiera que vayas.

Finalmente, agradezco con todo mi ser a la Dra. Nora Gutiérrez. Gracias por siempre ser paciente, por respetar mis horarios, mis tiempos y mis contratiempos. Es un gran modelo a seguir, no sólo como investigadora, sino como ser humano. Gracias por todo el apoyo que me brindó durante estos casi 3 años de ser su alumno, gracias por siempre recibirme con una sonrisa , por creer en mi y por enseñarme que no hay mejor manera de demostrar quién eres que con tu trabajo y calidad moral. ¡Muchas gracias!

Índice general

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas	2
Abreviaturas	3
Resumen	8
Introducción.....	10
I) Antecedentes.....	12
1.1. Suicidio.....	12
1.2. La corteza prefrontal dorsolateral.....	15
1.3. Bioquímica del suicidio	19
1.4. Objeto de estudio: las proteínas	22
1.5. Proteómica	27
1.5.1. Generalidades y breve historia	27
1.5.2. Separación de proteínas	31
1.5.3. Métodos de separación de proteínas	32
1.5.4. Métodos cromatográficos.....	32
1.5.4.1. Electroforesis monodimensional.....	36
1.5.4.2. Electroforesis Bidimensional (2DE SDS-PAGE).....	39
1.6. Métodos de identificación de proteínas	41
1.6.1. Espectrometría de masas.....	41
1.7. Métodos de ionización.....	42
1.7.1. Ionización por MALDI-TOF.....	42
II) Objetivos.....	46
2.1. Objetivo general	46
2.2. Objetivos particulares	46
III) Justificación	46
IV) Pregunta de investigación.....	46
V) Hipótesis	47
VI) Diseño de estudio	47
6.1. Selección de muestras	47
6.2. Criterios de inclusión para casos	47
6.3. Criterios de exclusión para casos.....	47
6.4. Criterios de inclusión para controles	47
6.5. Consideraciones éticas.....	48
VII) Materiales y Método.....	48

7.1. Tejido cerebral.....	48
7.2. Disgregación del tejido cerebral	49
7.3. Extracción de proteínas y estandarización para la selección del amortiguador de resuspensión.....	50
7.4. Cuantificación de proteínas por el método Lowry modificado	50
7.5. Separación de proteínas por electroforesis monodimensional.....	53
7.6. Tinción de geles con Coomassie	56
7.7. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional: Isoelectroenfoque	56
7.8. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional: SDS-PAGE	57
7.9. Tinción de geles bidimensionales con Sypro Ruby	59
7.10. Análisis de imágenes en software PDQuest.....	59
7.11. Análisis estadístico.....	60
7.12. Identificación de proteínas por espectrometría de masas acoplada a MALDI - TOF / TOF	61
7.13. Análisis de vías biológicas	62
VIII) Resultados.....	63
8.1. Extracción de proteínas y estandarización para amortiguador de resuspensión	63
8.2. Separación de proteínas por electroforesis monodimensional.....	65
8.3. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional e identificación por EM.....	67
8.4. Identificación de las proteínas candidatas	73
8.5. Análisis estadístico.....	77
8.6. Análisis de vías	80
IX) Discusión.....	83
9.1. Vía de respuestas a radicales libres.	83
9.1.1. Glutación S- transferasa Pi (GSTP1)	84
9.1.2. Proteína G(o), subunidad alfa 1 (GNAO1)	86
9.1.3. Peroxiredoxina 2 (PRDX2).....	88
9.1.4.....	90
Proteína de choque térmico de 60 KDa (HSDP1)	90
9.2. Vía del neurodesarrollo	92
9.2.1. Proteínas de choque térmico (Heat shock proteins): HSP90AA1 y HSP90AB1	92

9.2.2. Proteínas relacionadas a la bioenergética: CKB y LDHB	93
9.2.3. Proteínas relacionadas al citoesqueleto: YWHAG, YWHAZ, INA y GDA.....	95
9.2.4. Modelo de integración biológica.....	97
X) Conclusiones.....	100
XI) Limitaciones	101
XII) Perspectivas a futuro.....	101
XIII) Referencias.....	103

Índice de figuras

Figura 1: Factores de riesgo del suicidio.....	15
Figura 2: Esquema de la corteza prefrontal dorsolateral.....	16
Figura 3: Circuito cerebral del suicidio.....	18
Figura 4: Estructura básica de los aminoácidos.....	23
Figura 5: Dogma central de la biología molecular.....	27
Figura 6: Electroforesis en segunda dimensión.....	41
Figura 7: Enfoques de la EM aplicados a la proteómica.....	44
Figura 8: Curva estándar de BSA para determinación de proteína.....	52
Figura 9: Elaboración de geles de poliacrilamida.....	55
Figura 10: Gel de integridad.....	66
Figura 11: Geles bidimensionales.....	68
Figura 13: Geles maestros.....	72
Figura 14: Diagrama de volcán.....	77
Figura 15: Diagrama de resultados (screen plot).....	78
Figura 16: Mapa de calor.....	79
Figura 17: Red de interacción general de las proteínas candidatas.....	81
Figura 18: Vías biológicas en las que participan las proteínas candidatas	82
Figura 19: Interpretación biológica de las proteínas candidatas en la biología del suicidio.....	99

Índice de tablas

Tabla 1: Diferencias estructurales y funcionales de cerebros con intento suicida.....	17
Tabla 2: Recopilación de estudios de proteómica en suicidio.....	21
Tabla 3: Sistema y/o procesos con irregularidades relacionadas al suicidio....	22
Tabla 4: Funciones generales de diversos grupos de proteínas.....	26
Tabla 5: Tipos de técnicas cromatográficas.....	34
Tabla 6: Composición química del amortiguador Laemmli.....	37
Tabla 7: Claves de registro, tipo de muerte y datos sociodemográficos de las muestras.....	49
Tabla 8: Cantidades y reactivos necesarios para hacer la curva para la determinación de proteína en el extracto de tejido cerebral.....	51
Tabla 9: Reactivos necesarios para realizar geles de poliacrilamida al 12%	54
Tabla 10: Condiciones de isoelectroenfoque aplicados a las IPGs.....	57
Tabla 11: Contenido de la mezcla de equilibrio de las IPGs.....	58
Tabla 12: Estandarización de amortiguador para resuspensión de proteínas	64
Tabla 13: Rendimiento de proteína.....	65
Tabla 14: Proteínas candidatas.....	74

Abreviaturas

1 DE	Electroforesis en primera dimensión
2 DE	Electroforesis en segunda dimensión
AA´s	Aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Carbono
CH₂O₂	Ácido fórmico
CKB	Creatin Cinasa tipo B
CL	Cromatografía líquida
CL – EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
Cm³	Centímetros cúbicos
CPFDL	Corteza prefrontal dorsolateral
CPFL	Corteza prefrontal lateral
CPFM	Corteza prefrontal medial
CRYAB	Cadena B alfa cristalina
CTC	Carbonato – tartrato – cúprico
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
Dpi	Puntos por pulgada
DSM	Manual de Diagnóstico y Estadística de los trastornos mentales
DTT	Dithiothreitol

EM	Espectrometría de masas
EM -B – U	Espectrometría de masas bottom – up
EM / EM	Espectrometría de masas en tándem
ESI	Ionización por electrospray
EWAS	Estudio de asociación de expresión del genoma completo
FDR	Tasa de descubrimiento falso
F-C	Folin – Ciocalteous
g	Gramos
GABA	Ácido gamma aminobutirico
GDA	Guanin deaminasa
GE	General Electric
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GNAO1	Proteína G(o) subunidad alfa 1
GSTP1	Glutación S transferasa Pi
H	Hidrógeno
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSDP1	Proteína mitocondrial de choque térmico de 60 KDa
HSP90AA1	Proteína de choque térmico HSP-90 Alfa
HSP90AB1	Proteína de choque térmico HSP-90 Beta
HUPO	Organización del Proteoma Humano
Hz	Hertz
IEF	Isoelectroenfoque
Ig-G	Inmunoglobulina G

INA	Alfa internexina
INCIFO	Instituto Nacional de Ciencias Forenses
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
IPG´s	Tiras inmovilizadoras de gradientes de pH
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilo Daltones
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico
L	Levógiro
LDHB	L-lactato deshidrogenasa cadena B
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
m	Masa
M	Molar
MALDI	Desorción / Ionización láser asistida por matriz
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MPT´s	Modificaciones postraduccionales
N	Nitrógeno
Na₂HPO₄	Fosfato disódico
NaCl	Cloruro de sodio
NaDOC	Desoxicolato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NEFL	Neurofilamentos ligeros
NEFM	Neurofilamentos medios

NH₄HCO₃	Bicarbonato de amonio
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
° C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Punto isoelectrico
PKa	Constante de disociación ácida
PRDX2	Peroxiredoxina 2
PRDX 6	Peroxiredoxina 6
PSA	Persulfato de amonio
R	Cadena lateral
RCP	Proteína C reactiva
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS – PAGE	Dodecil sulfato de sodio – electroforesis en gel de poliacrilamida
SNC	Sistema nervioso central
SNP´s	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOD	Súper óxido dismutasa
SPS	Sociedad Sueca de Proteómica
TEMED	Tetramethylethylenediamina
TRIS	Trishidroximetilaminometano
UDO	Unidades de densidad óptica
V	Volts
V / h	Volts / hora
	Proteína 14-3-3- gamma

YWHAG

Proteína 14-3-3- zeta/delta

YWHAZ

z

Carga

µg

Microgramo

µL

Microlitro

Resumen

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el suicidio es una de las principales causas de muerte a nivel mundial en personas jóvenes de entre 15 y 29 años de edad. Este fenómeno es altamente complejo y no puede ser direccionado hacia una sola causa, sino que hay que evaluarlo mediante enfoques con múltiples factores de diferente naturaleza. Entre estos enfoques está el proteómico. La proteómica se refiere al estudio completo de las proteínas de un sistema biológico determinado a través del uso de múltiples técnicas de alta tecnología, como la espectrometría de masas. Además, permite analizar una gran cantidad de proteínas en una misma plataforma, ofreciendo la posibilidad de estudiar diferentes condiciones o grupos en un mismo experimento. Las proteínas son una parte fundamental en la vida, pues son las que permiten que se den gran parte de las funciones básicas en los sistemas vivos, pero también pueden estar involucradas en diversas patologías cuando su funcionamiento no es correcto o cuando se encuentran alteraciones en las mismas. En este estudio, se llevó a cabo el análisis de los cambios en el perfil proteómico de la corteza cerebral prefrontal dorsolateral (CPF DL) de individuos que consumaron el suicidio. Se extrajeron las proteínas del tejido anteriormente mencionado; realizando la disociación por maceración del tejido y centrifugación del extracto, así como el aislamiento de proteínas por el método cloroformo-metanol para su posterior separación por electroforesis bidimensional (2-DE SDS-PAGE). Posteriormente, se analizaron las imágenes digitalizadas de los geles bidimensionales. En estas se observaron las proteínas por tinción con Sypro Ruby o azul de coomassie se analizaron con el software PdQuest (de BioRad). En este análisis, se encontraron los valores de cambio entre las proteínas provenientes de la CPF DL de individuos que murieron por causas diferentes al suicidio y las de CPF DL de individuos que consumaron el suicidio. De aquí, se seleccionaron las proteínas que aumentaron o disminuyeron en suicidio comparados con los controles; y se cortaron de los geles de poliacrilamida para la extracción de proteínas por digestión con tripsina toda la noche y se separaron de los péptidos resultantes. Estos péptidos se identificaron por espectrometría de

masas y se utilizaron motores de búsqueda como Protein Pilot en la base de datos de UNIPROT y The Human Protein Atlas. Los resultados obtenidos muestran alteraciones en la expresión de dichas proteínas que están asociadas a aspectos biológicos de alta relevancia como las reacciones de Óxido-Reducción (REDOX), alteraciones en el ciclo celular, citoarquitectura, procesos apoptóticos y neurodesarrollo.

Introducción

De acuerdo a la OMS, el suicidio es una de las principales causas de muerte a nivel mundial en personas jóvenes de entre 15 y 29 años de edad. Este fenómeno es altamente complejo y no puede ser direccionado hacia una sola causa, sino que hay que evaluarlo mediante enfoques con múltiples factores de diferente naturaleza, desde psicosociales, hasta moleculares. En este último, podemos encontrar el enfoque de la proteómica, que se refiere al estudio completo de las proteínas de un sistema biológico determinado a través del uso de diversas técnicas de alta tecnología, como la espectrometría de masas. Además, permite analizar una gran cantidad de proteínas en una misma prueba, ofreciendo la posibilidad de estudiar diversas condiciones o grupos en un mismo experimento. Las proteínas son una parte fundamental en la vida, pues son las responsables de muchas de las funciones básicas en los sistemas vivos, pero también pueden estar involucradas en diversas patologías cuando su funcionamiento no es correcto o cuando se encuentran expresadas diferencialmente respecto a una condición control.

Actualmente se mira hacia una medicina personalizada, la cual tiene como propósito evaluar los riesgos médicos, monitorear, diagnosticar y tratar pacientes de acuerdo a su composición genética específica y fenotipo molecular. El advenimiento de la secuenciación del genoma humano y el análisis de los estados fisiológicos, han contribuido a ese propósito. Sin embargo, el genoma es difícil de interpretar y en el caso de varias enfermedades multifactoriales como diabetes, cáncer, trastornos psiquiátricos y enfermedades neurológicas, involucran la función de un gran número de genes, vías biológicas y factores ambientales que pueden ser muy difíciles de conjuntar. Así que la integración de la información genómica junto con un análisis molecular detallado de las muestras será importante para predecir, diagnosticar y tratar las enfermedades, así como para entender el inicio, progresión y prevalencia de los estados de enfermedad. La proteómica es una de las nuevas ciencias “ómicas”, que provee una aproximación bioquímica global para entender la regulación de las vías y redes metabólicas en un sistema biológico, pudiendo

complementar así los datos derivados de la genómica, transcriptómica y metabolómica en el estudio de las afecciones del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, aún son pocos estudios en el área de las neurociencias donde se aborda la integración de los datos de las diferentes ciencias “ómicas”.

Dado este escenario, es importante el entendimiento de los factores moleculares que contribuyen a trastornos psiquiátricos como la conducta suicida, así como búsqueda de nuevos biomarcadores que propongan alternativas para el diagnóstico, pronóstico, tamizaje o blancos para tratamientos terapéuticos.

Para el desarrollo de este trabajo, se requirió personal capacitado en la parte clínica (que proporcionó tanto los datos clínicos del individuo, así como las muestras de éstos mismos a estudiar) en la parte bioquímica (que se encargó de la extracción de las proteínas de las muestras), en la química analítica (que involucró la técnica de espectrometría de masas para la separación e identificación de las proteínas) y la bioinformática (que nos permitió organizar y analizar los datos obtenidos de los estudios proteómicos, así como para proponer posibles relaciones con la biología de la enfermedad). Todo lo anterior con fines de un mejor entendimiento de este tipo de trastornos y, con base en la información obtenida de este estudio, proponer las vías biológicas relevantes en el suicidio que pudieran conducir en un futuro a la propuesta de marcadores moleculares para este fenómeno.

I) Antecedentes

1.1. Suicidio

El suicidio, el acto de quitarse la vida de manera intencional, ha sido parte de la historia de la humanidad desde hace mucho tiempo, a pesar de que en la actualidad sigue siendo un tema tabú y estigmatizado. Desde la época griega, Plutarco llevó a cabo un estudio sobre los suicidios acontecidos entre los siglos IV y III A.C., en el que llegó a la conclusión de que había una elevada frecuencia de adolescentes griegos que consumaron el suicidio o que presentaron tentativas al mismo (Andrade, 2012).

La palabra suicidio proviene del latín *Suicidium*, formado por el prefijo *Sui* (de sí, a sí mismo) y el sufijo *Cidium* (acto de matar, del verbo *caedere*), siendo el escrito más antiguo el reportado por Gauthier de Saint Víctor, teólogo francés que empleó el término *suicida* en el año 1177-1178 (Salmán, 2011).

No obstante, el término *suicidio* no se restringe únicamente al suicidio consumado, sino que abarca toda aquella conducta en la que el individuo, frecuentemente consciente, ejecuta ciertas acciones o se abstiene de realizar otras, con el fin de causarse daño a sí mismo (Tovilla y Genis, 2012).

En el Manual de Diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales (DSM-V, 2013), la conducta suicida puede ser categorizada de acuerdo al nivel de violencia del método utilizado, agrupando así el uso de armas de fuego y salto de grandes alturas en el rubro “violento”, y al consumo de sustancias legales o ilegales en el “no violento”. Otra forma de clasificar la conducta suicida según este manual, es de acuerdo al grado de letalidad que se presenta, siendo poco letales aquellos en los que sólo se termina en una visita a urgencias y altamente letales en los que requieren una atención hospitalaria más especializada.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay una muerte por suicidio cada 40 segundos, es decir, cerca de 800.000 personas se suicidan al año en todo el mundo y un número mayor lo intenta, pero no logra consumarlo. Estas cifras son alarmantes y posicionan al suicidio como la segunda causa principal de muerte en personas de entre 15 y 29 años. El 78% de estos casos fueron reportados en países de economía media y baja, lo que lo convierte en un problema de salud pública a nivel global (OMS, 2015).

Borges y Cols., (2016) mencionan que de acuerdo con datos del informe de la OMS, basados en el registro nacional, en México el número de suicidios entre los años 2000 y 2012 aumentó en un 10.6% y la tasa de suicidios aumentó en un 17.1%. Así, el suicidio se posiciona como la quinta causa de muerte en individuos de hasta 34 años y la tercera en población mexicana de entre 15 y 24 años (Borges *et al.* 2012).

Borges también señala que estudios realizados en 2008 arrojan cifras alarmantes respecto a la tasa de suicidio en el país, teniendo así que entre el 2.5 y 4.3% de la población de toda la República Mexicana han tenido un intento de suicidio, lo que en números es 593.600 por año. De la misma manera, 6.601.210 personas han tenido ideación suicida y 99.731 han hecho usos de servicios médicos por intento suicida.

Por otro lado, un estudio demográfico realizado por Romero *et al* (2018); muestra un aumento en la tasa de suicidios del año 2000 al 2015, siendo este de 5.05 a 8.50 para hombres (por cada 100,000 habitantes) y de 1.06 a 2.0 para mujeres.

No existe una causa única que ocasione el suicidio. Existen muchos factores de riesgo que pueden llevar a una persona a tomar esta decisión. Sin embargo, el comportamiento suicida tiene una alta comorbilidad con trastornos mentales, siendo los más comunes el trastorno bipolar, el trastorno de depresión mayor y la esquizofrenia, entre otros. No obstante, en algunos casos este comportamiento también se da por motivos religiosos, políticos y/o como reacción a una experiencia

traumática o dolorosa (DSM-V, 2013). En un estudio realizado por Turecki y cols. en 2014, con 3275 muestras de cerebros *post-mortem*, concluyeron que la mayoría de estos casos presentaron un trastorno psiquiátrico, destacando primeramente el trastorno depresivo mayor, seguido de la esquizofrenia, trastorno por consumo de drogas y/o trastorno de la personalidad (Turecki *et al.* 2014).

Se ha propuesto un modelo de estrés-diátesis para el comportamiento suicida, que describe la relación entre la respuesta a un estresor y la susceptibilidad al suicidio (Van Heeringen, 2012). La diátesis es un término clínico que se refiere a una constitución del cuerpo que hace que reaccione de una manera específica a un estímulo extrínseco, haciendo que una persona sea más susceptible que el resto a una padecimiento en particular (Mann, 2003).

La correlación biológica con el modelo diatésico del suicidio puede proveer biomarcadores de riesgo a este, que sean distinguibles de los biomarcadores de otros desórdenes mentales concurrentes y que pueden servir para identificar factores de riesgo después de una experiencia traumática o del desarrollo de algún trastorno psiquiátrico. A la par, este modelo brinda la oportunidad de integrar fenotipos neurobiológicos con perspectivas clínicas y cognitivas en el estudio y prevención del suicidio (Van Heeringen, 2012).

Dado que, como ya se mencionó, el suicidio no tiene una causa aparente, Turecki menciona otros agentes que pueden influir este, agrupándolos en factores distales, que son aquellos que aumentan la predisposición al suicidio pero que tienen una relación temporal distante al mismo, y los proximales, que suelen generar crisis de este comportamiento que están típicamente relacionadas a eventos estresantes recientes y fuertemente asociados al comienzo de eventos psicopatológicos. Los subgrupos de factores de riesgo se muestran en la Fig.1.

No obstante a lo anterior, Mann (2003) propone que hay otros factores de riesgo de naturaleza social, como vivir en zonas rurales, el desempleo, la pobreza, la posesión de armas propias y el aislamiento social.

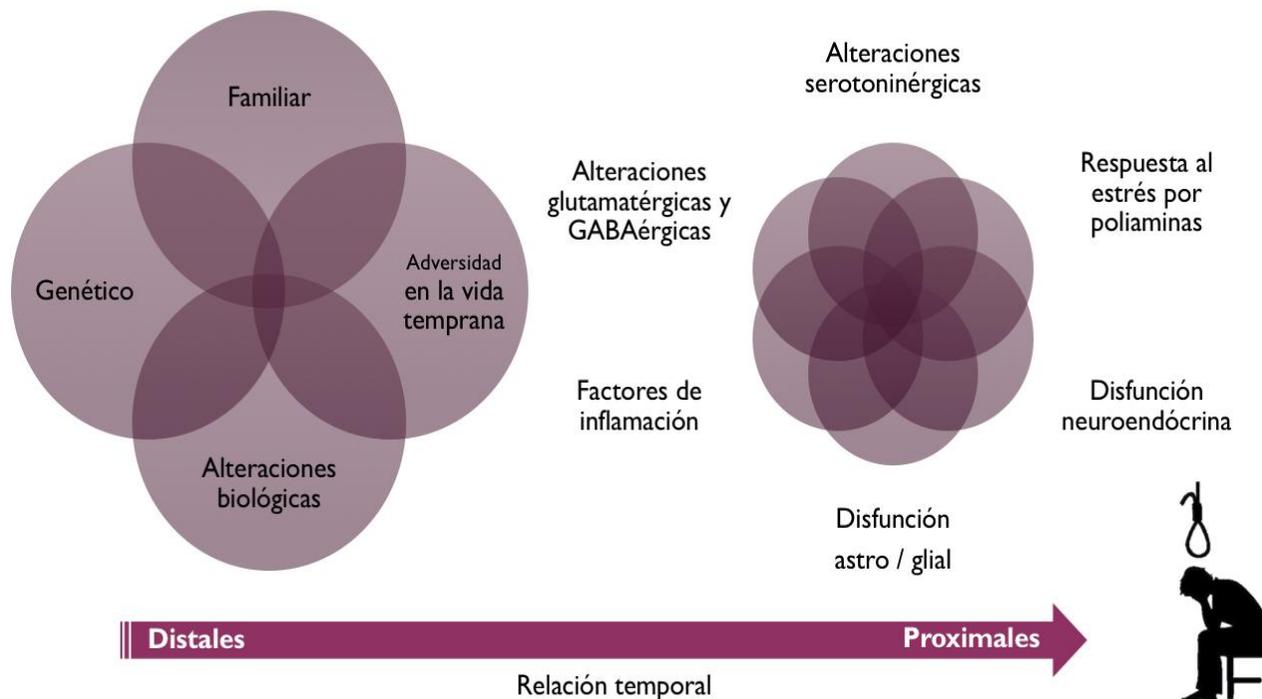


Figura 1. Factores de riesgo del suicidio. La flecha indica la relación temporal de dichos factores respecto al suicidio, siendo estos los distales y los proximales. Tomado y modificado de Turecki *et al*, 2014.

1.2. La corteza prefrontal dorsolateral

La corteza cerebral es una región de suma importancia en el sistema nervioso central (SNC), de hecho, su expansión caracteriza la evolución de los mamíferos. En ella, se puede encontrar un alto grado de diferenciación y de funcionalidad, asociando así las conductas más complejas del ser humano, tales como; la conciencia, el estado de ánimo, la motivación, el pensamiento, la memoria, el lenguaje, la creatividad, la programación y la ejecución de actividades motoras voluntarias (Pimienta, 2004).

Esta región cerebral, a pesar de ser tan heterogénea, cuenta con múltiples conexiones tanto con ella misma, como con el resto del SNC (telencéfalo,

diencéfalo, tallo cerebral, médula espinal, etc.), formando así un sistema de proyecciones nerviosas que participa en mecanismos de control y ejecución de naturaleza sensorial, perceptiva, cognitiva y motora. Por lo anterior, aunque regionalizar citoarquitectónicamente el cerebro ha sido de gran ayuda en estudios evolutivos, neuroquímicos, de imagenología y de conexiones, el hecho de que inerve con tantas zonas hace que asociar una función con una única área del cerebro sea muy simplista, incluso podría no ser correcto, ya que por los axones no se sabría dónde empieza ni dónde termina dicha región (Pimienta, 2004).

La corteza cerebral prefrontal dorsolateral (CPF DL) es sumamente compleja en primates, proviendo así una serie de funciones diversas y flexibles, entre las que destacan las “funciones ejecutivas complejas”. Éstas últimas son importantes en el circuito neurobiológico asociado al suicidio, pues entre ellas se encuentran la capacidad para resolución de problemas, la moderación del comportamiento social y la toma de decisiones, así como la predicción de consecuencias a acciones futuras (Martins de Souza *et al.* 2009). De esta manera, la CPF DL se presenta como una neuroregión cuyas alteraciones podrían causar que estas funciones ejecutivas complejas estén involucradas en el fenómeno del suicidio, se puede observar en la Fig. 2.

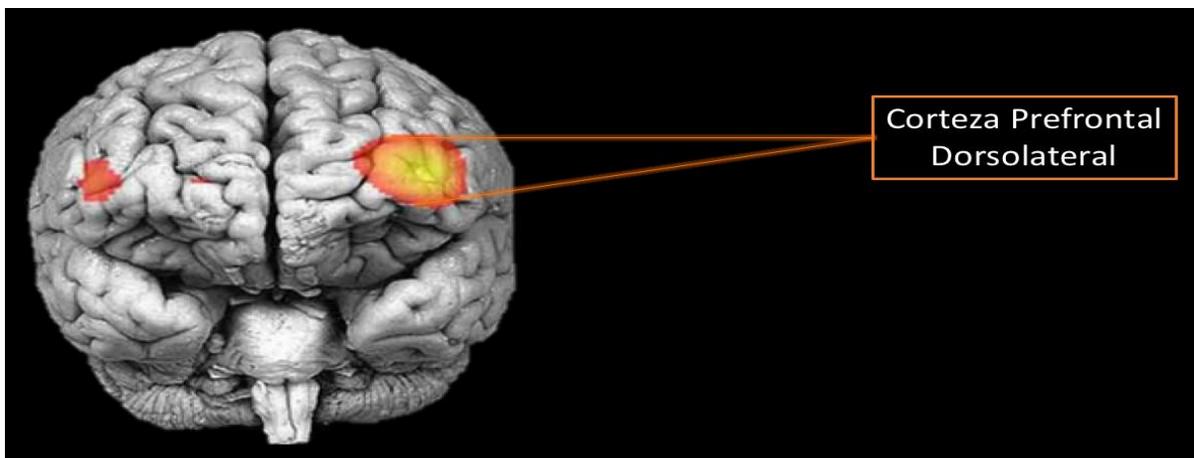


Figura 2. Esquema de la corteza prefrontal dorsolateral en un cerebro humano. Tomado y modificado de Aranyi *et al.*, 2016.

Diferentes autores han hecho estudios neuroanatómicos con muestras *post mortem* de individuos que consumaron el suicidio, en los que se han reportado cambios a nivel de neuronas, astrogliá y oligodendrocitos tanto en áreas corticales, como subcorticales. A nivel de la CPFDL observaron atrofia celular y baja densidad neuronal (Van Heeringen y Mann, 2014).

Los estudios de las bases biológicas del suicidio también han tenido un enfoque desde la neuroimagenología, con la cual se han estudiado diversas regiones del cerebro *in vivo*, destacando la corteza cerebral y haciendo especial énfasis en regiones como la corteza prefrontal medial (CPFM), la corteza prefrontal lateral (CPFL) y la CPFDL. Los estudios en CPFL mostraron que esta área está relacionada con la letalidad en el intento suicida en pacientes diagnosticados con síndrome de depresión mayor. En cuanto a la CPFDL, se observó que está involucrada en la regulación emocional en individuos con depresión que intentaron suicidarse y que hay cambios en la actividad cerebral (Van Heeringen y Mann, 2014).

Mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se han visto cambios en diferentes circuitos neuronales en personas con intentos de suicidio (Tabla 1).

Tabla 1

Diferencias estructurales y funcionales de cerebros de personas con intento suicida. Tomado y modificado de Van Heeringen y Mann, (2014)

Región cerebral	Observaciones estructurales en la materia gris (lado derecho)	Observaciones en conectividad funcional
Corteza Orbitofrontal	Déficit en volumen	Reactividad alterada ante diversos estímulos
<u>Corteza Prefrontal Dorsolateral</u>	<u>Déficit en volumen</u>	Reactividad alterada ante diversos estímulos
Corteza Ventromedial derecha	—	Reactividad alterada ante diversos estímulos
Ínsula	Déficit en volumen	Disminución de conectividad funcional
Giro Temporal Superior	Déficit en volumen	—

Caudado	Déficit en volumen	—
Globo pálido	Déficit en volumen	—
Tálamo	Aumento en volumen	—
Amígdala derecha	Aumento en volumen	—

Nota: Se muestran las regiones cerebrales estudiadas, así como las observaciones respecto al cambio en dichas regiones a nivel de materia gris y conectividad neuronal encontradas mediante RMN.

Se ha propuesto un neurocircuito relacionado a la conducta suicida, esto mediante los cambios observados en estudios *post-mortem* de neuroimagen, proponiendo que la serotonina modula diferentes componentes cruciales en personas que intentan suicidarse (Jollant *et al.* 2007). De esta manera, se mencionan regiones cerebrales involucradas en el suicidio, las cuáles se muestran en la Fig. 3.

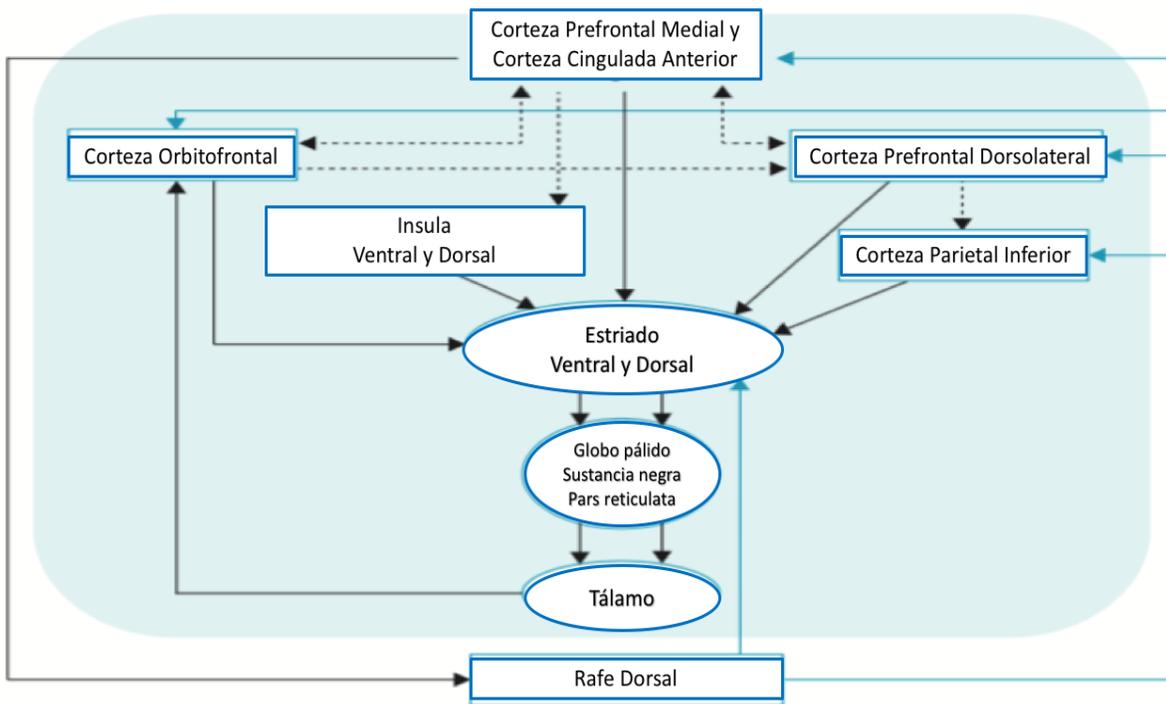


Figura 3. Circuito del suicidio. Regiones cerebrales en las que se han visto cambios estructurales y funcionales asociados al comportamiento suicida a través de estudios *post-mortem* y de neuroimagen. Las líneas punteadas representan las conexiones corticales, las líneas azules y las flechas indican el circuito serotoninérgico desde el rafe dorsal. Imagen adaptada por Van Heeringer y Mann, 2014, con la información de Tanaka *et al.* (2004).

Actualmente, los tejidos son una de las herramientas de mayor importancia en la investigación de múltiples enfermedades y espectros, puesto que la manifestación de dichas enfermedades se puede observar claramente a este nivel de organización celular. Sin embargo, muchos de los estudios a nivel de tejidos se realizan *in vivo* mediante imagenología o, en otros casos, mediante biopsias. No obstante, estudiar a los tejidos desde un enfoque molecular y/o bioquímico, podría permitir esclarecer de mejor manera los mecanismos de estas patologías y así poder generar biomarcadores moleculares que nos ayuden a determinar un mejor diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento (Norris y Caprioli, 2013).

Los biomarcadores pueden definirse como aquellas moléculas “medibles” provenientes de una muestra biológica, cuyos niveles de presencia / ausencia son indicativos del desarrollo de alguna patología o que sirven como referencia respecto a grupos controles. Actualmente, este tipo de marcadores son de gran importancia en la práctica clínica y de investigación, pues pueden brindar información útil en el diagnóstico y gravedad de algunas enfermedades, así como en el pronóstico y la evaluación respuesta – tratamiento, proporcionando incluso información en cuanto a la subsecuente recuperación (Pertuz *et al.*, 2016).

1.3. Bioquímica del suicidio

La psiquiatría y los desórdenes mentales nunca se han abordado desde un solo punto de vista, Huertas (2001) en su texto *Historia de la psiquiatría, ¿por qué? ¿para qué? Tradiciones historiográficas y nuevas tendencias*; menciona algo muy importante: Siempre se ha podido ver que los desórdenes mentales existen, pero su tratamiento, diagnóstico, y, más aún, la manera en la que lo entiende la gente, varían dependiendo de la cultura, de la sociedad y del momento histórico en contexto.

El enfoque bioquímico es uno de los que ha tomado mayor fuerza en los últimos años. Aparentemente, desde hace tiempo se pensaba que los desórdenes mentales

tenían un origen orgánico y no era sólo una cuestión psicosocial, esto después de que Hofmann en 1943 vio inintencionalmente el efecto alucinógeno que producía la dietilamida del ácido lisérgico o LSD, por sus siglas en inglés, hipotetizando así que si este alcaloide podía causar efectos psicóticos en personas que lo consumían, entonces una sustancia tóxica en el cerebro podría estar generando el mismo efecto en los enfermos mentales. Así, con este enfoque, para 1954 se había postulado a la serotonina (por Woolley y Shaw) y al adrenocromo (por Hoffer, Osmond y Smithy) como responsables de trastornos mentales como la esquizofrenia (Sourkes, 1961).

Luego de ello, se han hecho múltiples estudios y experimentaciones de este tipo para los diferentes trastornos psiquiátricos, siendo la hipótesis más enfatizada la de una mala regulación en la transmisión serotoninérgica. Sabiendo que más de un neurotransmisor puede estar involucrado, se han propuesto también alteraciones en la transmisión GABAérgica y glutamatérgica (Kékesi *et al.* 2012), así como en la dopaminérgica, la transducción de señales y la morfología celular (Mann, 2003).

Mediante estudios de tipo perfil de expresión del genoma completo (expression-wide analysis - EWAS), se han identificado anomalías en genes asociados a neurotransmisores corticales como glutamato y ácido gamma amino butírico (GABA), factores de crecimiento, poliaminas, vesículas sinápticas y glía en individuos que murieron por suicidio o que presentaron algún trastorno de la personalidad (Fiori y Turecki, 2012). Se ha propuesto además el posible papel de la apoptosis (muerte celular programada) mediada por poliaminas en la susceptibilidad a presentar comportamiento suicida a través de una reducción neurodegenerativa de los volúmenes de materia gris (Le-Niculescu *et al.* 2013).

En cuanto a proteómico, algunos estudios han postulado alteraciones en la expresión de proteínas que podrían servir como biomarcadores del suicidio (Tabla 2).

De esta manera, al ser un fenómeno tan complejo, el interés en los cambios bioquímicos en el suicidio ha tenido lugar en estudios con enfoques en ADN (genómica), en los niveles de expresión del ARNm (transcriptómica), en los perfiles proteicos (proteómica) y en los metabolitos (metabolómica).

En cuanto a los estudios genómicos, se han encontrado irregularidades en la expresión de genes como *GLUL*, *SLC1A3* (Kim *et al.* 2007), *GRIN2A* y *GRINL1A* (Klempner *et al.* 2009), todos ellos involucrados en la regulación glutamatérgica. Por otro lado, también se han encontrado irregularidades en la neurotransmisión GABAérgica en los genes *GABRA1* y *GABRB3* (Choudary *et al.* 2005), *GABRA4* y *GABRA5* (Sequeira *et al.* 2009).

Tabla 2
Recopilación de estudios de proteómica en suicidio

Autor (es) y año	País	Proteína, vía o agrupación proteica propuesta	Muestra analizada	Condición en la que se llevó a cabo la toma de muestra
Swaab, D.F. <i>et al.</i> 2016	Holanda	Ciclo glutamina – glutamato	Corteza prefrontal	<i>Postmortem</i>
Ducasse, D. <i>et al.</i> 2015	Francia	RCP	Muestra sanguínea	<i>Premortem</i>
Hayley, S. <i>et al.</i> 2015	Canadá	BDNF	Corteza prefrontal e hipocampo	<i>Postmortem</i>
Kékesi, K. <i>et al.</i> 2012	Hungría	GFAP INA PRDX6 NEFL NEFM	Corteza prefrontal y amígdala	<i>Postmortem</i>
Bondy, B <i>et al.</i> 2007.	Alemania	GFAP CRYAB SOD2	Corteza prefrontal (Área de Brodman 10)	<i>Postmortem</i>

Nota: Las muestras postmortem pertenecen a suicidio consumado y las premortem a intento suicida. Abreviaciones por sus siglas en inglés: RPC- Proteína C Reactiva. BDNF- Factor neurotrófico derivado del cerebro. GFAP- Proteína fibrilar ácida de la glia. INA- Alfa internexina. PRDX6- Peroxiredoxina 6. NEFL- Neurofilamentos ligeros. NEFM- Neurofilamentos medios. CRYAB- Cadena alfa-cristalina B. SOD2- Superóxido dismutasa 2.

De manera general, los circuitos o redes moleculares que se han visto modificados en cerebros *postmortem* de individuos que se suicidaron se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Sistemas y / o procesos con irregularidades relacionadas al suicidio. Tomado y modificado de Furczyk et al. (2013).

Sistema o proceso biológico	Irregularidades a nivel de:
Dopaminérgico	Recaptura de dopamina
Endocannabinoides	Receptores
Glutamatergico	Receptores
Neuroendocrinológico	Hormonas y receptores
Noradrenérgico	Receptores y enzimas
Plasticidad neuronal	Factores neurotróficos (como BDNF)
Poliaminas	Putrescina y Espermina
Señalización celular	Proteínas Cinasas, Interleucinas, etc.
Serotoninérgico	Transportadores, enzimas y receptores

1.4. Objeto de estudio: las proteínas

Desde hace ya mucho tiempo se sabe la importancia que tienen las proteínas en el desarrollo de la vida. Estas son consideradas uno de los cuatro miembros de las macromoléculas esenciales junto con los ácidos nucleicos, los carbohidratos y los lípidos.

Las proteínas están formadas por monómeros llamados aminoácidos (AAs), que, como su nombre sugiere, están constituidos por dos grupos funcionales: el grupo

Las proteínas están formadas por una o más cadenas polipeptídicas, en donde cada polipéptido tiene un grupo amino y un grupo carboxilo libre en cada extremo Solomon *et al.* (2011).

Las proteínas cuentan con niveles estructurales, siendo estos el primario (I), el secundario (IIA y IIB), el terciario (III) y el cuaternario (IV), así como los motivos estructurales (II.I), los cuales se detallan a continuación de acuerdo a Solomon *et al.* 2011.

- I) La estructura primaria es definida por la secuencia de aminoácidos unidos por los enlaces peptídicos anteriormente mencionados. Esta secuencia estará determinada por la información genética específica para cada proteína de un sistema biológico cualquiera y es la que le dará la conformación de una proteína, así como su función.
- II) El siguiente nivel de organización recibe el nombre de estructura secundaria, una cadena que es estabilizada por enlaces de hidrógeno. Dentro de este nivel, se pueden encontrar las cadenas α -hélice (IIA) y la lámina β -plegada (IIB), cuyo nombre únicamente denota el orden en el que se descubrieron. La estructura α -hélice es la región en la que la cadena polipeptídica adquiere una forma de espiral helicoidal uniforme causada por factores físicos y químicos, en la que cada vuelta completa contiene 3.6 AAs. Esta estructura es completamente flexible y elástica. Por otro lado, las láminas β -plegada presentan una disposición tipo zig zag, también estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre el mismo o diferentes polipéptidos, doblando así hacia atrás entre sí a la lámina en distintas regiones, provocando que sea flexible, pero no elástica.
- II.I) Existe un nivel de organización intermedio al secundario y al terciario. Este corresponde al de los motivos estructurales. Dichos motivos se forman cuando elementos comunes de estructura secundaria (como α -hélice y β -

plegada) se conectan unos con otros para funcionar como un solo elemento. Un ejemplo de este nivel de organización son los dedos de zinc.

- III) La estructura terciaria de una molécula proteica corresponde a la forma global que toma por cada una de sus cadenas polipeptídicas, formando una estructura tridimensional (3D) determinada por cuatro factores relacionados a las interacciones entre las cadenas laterales (grupos R), que son: enlaces hidrógeno entre grupos R de ciertos AAs, enlaces iónicos entre grupos R de un AA con carga positiva y otro con carga negativa, interacciones hidrófobas de AAs no polares que por el medio circundante de agua se orientarán al interior de la estructura globular y finalmente los puentes disulfuro que unen los átomos de azufre cada dos subunidades de cisteína presentes en la misma cadena polipeptídica.
- IV) Finalmente, la estructura cuaternaria, es el resultado de las interacciones entre polipéptidos, pues están compuestas de dos o más cadenas de esta naturaleza que interactúan entre sí de manera específica para formar una molécula biológicamente activa. La estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes (propiedades emergentes). Dichas subunidades se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos.

La diversidad y número de funciones que desarrollan las proteínas en los diferentes organismos es realmente inmensa, desde la degradación de los alimentos que ingerimos, el crecimiento de cabello y uñas, hasta la regulación estricta en los diferentes procesos fisiológicos de todas las formas vivientes. Lo anterior siguiendo las “instrucciones” codificadas en el genoma de cada población, especie y, particularmente, de cada individuo (Segovia y Soberón, 2007).

Dentro del grupo de las macromoléculas, las proteínas encabezan la lista en cuanto a diversidad estructural y funcionalidad, algunas de ellas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

Funciones generales de diversos grupos de proteínas. Tomado y modificado de Hillis et al. 2012.

Clase de proteína	Función	Ejemplo
Enzimas	Catalizan y aceleran las reacciones bioquímicas	Peroxidasas (Glutación peroxidasa)
Proteínas de defensa	Reconocen y responden a sustancias o partículas que provienen del exterior y entran al organismo	Anticuerpos (Ig-G)
Proteínas hormonales y regulatorias	Controlan procesos fisiológicos	Insulina
Receptores proteínicos	Reciben y responden a las señales moleculares desde dentro y fuera del organismo	Receptores de neurotransmisores (Receptor de Serotonina)
Proteínas de almacenamiento	Almacenan aminoácidos para uso futuro	Mayormente en óvulos y semillas (Ovoalbúmina)
Proteínas estructurales	Proveen estabilidad física y movimiento a las células	Colágeno
Proteínas de transporte	Acarrean sustancias por todo el cuerpo	Hemoglobina
Proteínas de regulación génica	Regulan cuándo, cómo y qué genes serán expresados.	Histona metiltransferasa

Nota: Ig-G: inmonoglobulinas-G.

1.5. Proteómica

1.5.1. Generalidades y breve historia

El área de estudio específica para las proteínas se denomina proteómica. Esta se encarga del estudio del proteoma, término acuñado por Marc Wilkins en el año 1994, definiendo a este último como el contenido total de proteínas que se encuentran en una célula, tejido o cualquier otro sistema biológico definido (análogamente con los genes y el término “genoma”). Sin embargo, en ese año, la tecnología para realizar estudios del proteoma no estaba tan desarrollada y estudiar una sola proteína llevaba meses de arduo trabajo, por lo que conocer el proteoma de cualquier sistema biológico era muy difícil de conseguir. A pesar de ello, en los últimos 20 años, la proteómica ha pasado de ser una promesa a un conjunto maduro de tecnologías que han permitido, por ejemplo, la publicación de las primeras versiones del borrador completo del proteoma humano en 2014 (Lenz y Dihazi, 2016).

El desarrollo de la proteómica surge a raíz de la idea de que un gen codifica un producto final más complejo y funcional, siguiendo la estructura del llamado dogma central de la biología molecular, el cual está representado en la Fig. 5.

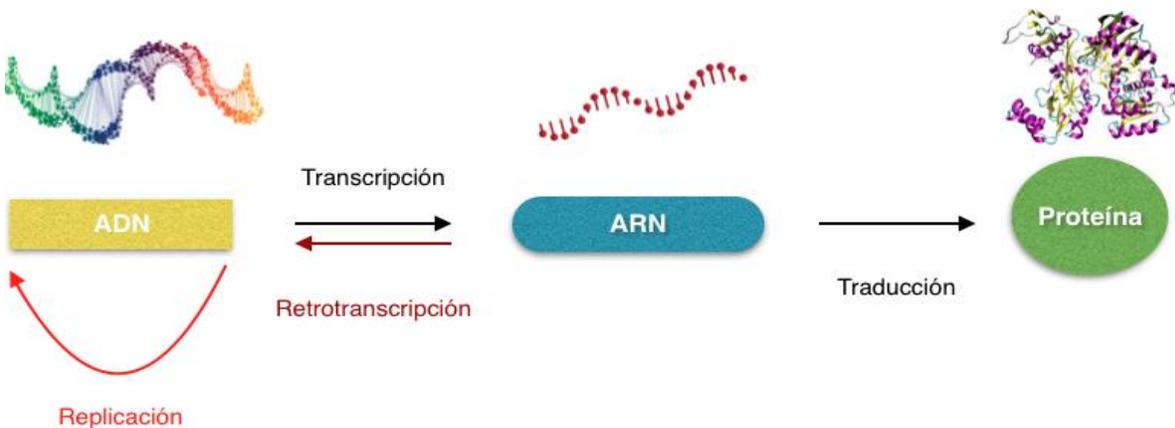


Figura 5. Dogma central de la biología molecular. Se muestra el flujo de información desde ADN y ARN hasta las proteínas.

Esto significa que las proteínas brindan información que los genes no proporcionan, dicha información es inherentemente más compleja y cercana a una posible funcionalidad dentro de un organismo. Así, el objetivo de esta área del conocimiento, es obtener una visión más global e integrativa de la biología mediante el estudio de todas las proteínas de los diferentes niveles de organización, desde una célula hasta un organismo completo (Graves y Haystead, 2002).

Como se mencionó anteriormente, el estudio del proteoma permite obtener una cantidad de información mayor que la del genoma, dado que el primero es el resultado de la expresión de miles de genes y la complejidad aumenta al considerar, además, las modificaciones post-traduccionales (MPTs) de las proteínas, en dónde se pueden encontrar grandes variaciones a diferentes rangos. Dichas modificaciones se refieren a cambios en la estructura de las proteínas *a posteriori* a su síntesis, que pueden comprometer la funcionalidad de las mismas. Existen más de 200 MPTs, las más comunes son la acetilación, la glucosilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la metilación (Wright *et al.* 2012).

Es importante recordar que la síntesis de proteínas es el resultado final de la expresión génica, incluso cuando no toda la expresión del ARNm (transcriptómica) desencadena en proteínas (Camprubí-Rimblas *et al.* 2015) logrando que la proteómica ofrezca un panorama más amplio que el de la genómica, pues esta última describe el genotipo de un sistema biológico, mientras que la proteómica describe su fenotipo, el cual incluye tanto la parte genotípica, como el pasado y el presente del ambiente con el que interactúa el organismo (Cox y Mann, 2011). Sin embargo, sería imposible hacer análisis proteómicos sin las bases de datos de secuencias genómicas, dejando expresamente su complementación en los estudios moleculares (Westermeyer y Naven, 2002).

Es claro que la mayoría de la información funcional de los genes reside en el proteoma, qué, como se dijo antes, es la suma de múltiples procesos dinámicos como las MPTs, el tráfico de proteínas y las interacciones entre las mismas. No

obstante, es también importante considerar que el proteoma es dinámico, es decir, que la célula no expresará las mismas proteínas en un momento que en otro y, a su vez, que no todas las proteínas tendrán el mismo número de copias, sino que habrá diferentes números dependiendo de la función de las mismas, logrando tener desde 30 hasta 100.000 copias de la misma proteína en una célula (Chandramouli y Yuan Qian, 2009). Dentro del dinamismo del proteoma, además de su síntesis y las MPTs, entran las translocaciones y la degradación de proteínas (Morales y Gallo, 2006). Se especula que en el humano existen alrededor de 20.000 proteínas diferentes, esto bajo la idea de que el genoma se expresará de manera idéntica en el proteoma, es decir, un gen codificará para una proteína. Sin embargo, el número de proteínas posibles en el humano aumenta al considerar dos fenómenos biológicos que suelen suceder. El primero de ellos es el conocido *splicing* alternativo del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el cual podría generar un mayor número de proteínas mediante los llamados polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, por sus siglas en inglés. El segundo de estos fenómenos se refiere a las ya mencionadas MPTs, que cambian el estado de las proteínas, lo que provoca diferentes proteoformas que podrían resultar en interacciones proteína-proteína diferentes y en funcionalidad variable (Feliciano *et al.* 2015).

Las alteraciones en las secuencias de proteínas (provocadas por mutaciones en genes), así como la abundancia de las proteínas con MPTs pueden modular o desregular su funcionalidad y estar asociadas a alguna condición patológica o de drogas. De esta manera, la proteómica ofrece la ventaja de que, usando sus diferentes enfoques, puede generar información crucial para lograr entender diferentes patologías bajo su verdadero contexto molecular, lo cual puede permitir el desarrollo de biomarcadores en enfermedades (enfoque de proteómica clásica) e incluso al desarrollo de medicamentos específicos que puedan tratarlas (enfoque de proteómica estructural) (Feliciano *et al.* 2015).

Así, la proteómica se define como la aplicación de tecnologías de alto rendimiento para el análisis de la expresión de proteínas de diferentes muestras y/o sistemas biológicos, a través de múltiples condiciones (Boersema *et al.* 2015).

Con todas las consideraciones ya mencionadas, la proteómica puede tener diferentes enfoques según el objetivo, teniendo así tres principales tipos: la proteómica de expresión, la estructural y la funcional. La primera se encarga de ver los niveles de expresión del proteoma entero de una célula u organelo, brindando así información cuantitativa, es decir, la cantidad relativa o absoluta de proteínas en una muestra. En cuanto a la proteómica estructural, se encarga de la investigación de la localización proteica en el sistema biológico de interés, así como de las interacciones proteína-proteína. Finalmente, la proteómica funcional permite el estudio y caracterización de grupos peculiares de proteínas, extrayendo información acerca de la localización subcelular, señalización proteínica, modificaciones post-traduccionales, mecanismos de enfermedades e interacciones proteína-droga, entre otras (Camprubí-Rimblas *et al.* 2015). Por tanto, estos estudios brindan información tanto cualitativa, como cuantitativa (Wright *et al.* 2012).

Históricamente, se puede dividir en tres grandes etapas de acuerdo al desarrollo de las diferentes tecnologías y los avances que se fueron dando paulatinamente en su campo. La primera parte corresponde a la fundación, es decir, todo lo ocurrido antes del año 2001, cuando se desarrolla la técnica de electroforesis en segunda dimensión en geles de poliacrilamida o 2D SDS - PAGE, por sus siglas en inglés (Lescuyer *et al.* 2012).

La etapa número dos, conocida como la etapa de evolución, que empieza aproximadamente en el año 2001 con el nacimiento de la Human Proteome Organization (HUPO) y la Swedish Proteomics Society (SPS). Durante este periodo, la espectrometría de masas (EM) tomó el liderazgo sobre el estudio de proteínas basado en geles, ya que se desarrollaron instrumentos relacionados a la EM con capacidades analíticas impresionantes. Los progresos en dicha instrumentación se combinaron con el fraccionamiento y marcaje de proteínas, lo que permitió que se

cuantificaran e identificaran un gran número de éstas últimas, abriendo así el camino a los estudios relacionados a MPTs. No obstante, durante esta etapa, también se dio la simbiosis entre la bioinformática, las bases de datos y las nuevas tecnologías para el estudio del proteoma, lanzando así en UniProt en el 2008, un set “completo” de 20, 000 proteínas humanas (Lescuyer *et al.* 2012).

Toda esta evolución pasó a un estado de madurez, logrando que la proteómica sea ahora una herramienta de suma importancia en la investigación biológica y biomédica. Así, se llega a la tercera fase de la proteómica: la fase de traducción. Ésta última etapa permite involucrar a las proteínas de manera masiva en la biología celular y la biología de sistemas, así como en la búsqueda de biomarcadores de distintas patologías, la validación experimental y la aplicación clínica de los resultados derivados de los experimentos (Lescuyer *et al.* 2012).

A continuación, se describen los pasos a seguir para llevar a cabo un estudio mediante el enfoque proteómico.

1.5.2. Separación de proteínas

Una de las partes cruciales en la identificación de biomoléculas recae en su separación. Es necesario que la técnica usada para ejecutar este proceso, cumpla con la característica de poder analizar muestras complejas (como la mayoría de las muestras biológicas) y que además tenga una alta resolución de las mismas. No obstante, la separación de proteínas presenta un reto adicional, pues estos analitos son complejos por sí mismos y tienden a la precipitación (Rabilloud y Lelong, 2011).

Para que las proteínas puedan ser separadas de manera correcta, es necesario que, sea cual sea el método que se utilice, la muestra esté libre de cualquier otro tipo de macromolécula contaminante como carbohidratos, ácidos nucleicos o lípidos, por lo que se lleva a cabo una depuración previa de los mismos, así como la extracción de las proteínas. El método de extracción de proteínas será diferente

de acuerdo al tipo de muestra biológica a analizar, siendo diferentes entre célula-tejido, célula-célula, tejido-tejido, etc. (Medina, 2013).

1.5.3. Métodos de separación de proteínas

Se han desarrollado diversos métodos de separación y se han logrado combinar para obtener mejores resultados. Actualmente, dos de los métodos más usados corresponden a las técnicas de electroforesis y de cromatografía.

1.5.4. Métodos cromatográficos

La cromatografía es el término empleado para referirse a una familia de técnicas de separación de diversos compuestos moleculares en función de sus propiedades físico-químicas. Su nombre proviene del latín *kromos* (color) y *graphos* (descripción) y se debe a que los primeros estudios de separación de muestras complejas se dieron en plantas, en donde muchos de los compuestos separados por esta técnica eran pigmentos que se manifestaban como bandas coloridas. De manera general, el principio de la cromatografía involucra un proceso de migración diferencial de los compuestos de una mezcla al usar dos fases: la fase estacionaria, en donde los compuestos son retenidos, y una fase móvil, que puede ser un líquido, gas o una combinación de varios líquidos, que fluyen permanentemente durante el análisis (FEUM, 2016).

Existen diferentes tipos de cromatografía según los compuestos que se requieran separar, sin embargo, la cromatografía líquida (CL) es una de las más empleadas en la separación de proteínas y ésta, a su vez, se puede dividir en diferentes tipos, una vez más, de acuerdo a las distintas propiedades físico-químicas de las proteínas de interés, pudiendo así separarlas en función de su hidrofobicidad, tamaño, carga, etc. La Tabla 5 resume esta información. Lo que se debe resaltar para todas ellas, es que la fase estacionaria consta de un soporte sólido enriquecido con diferentes sustancias que sean aptas para el análisis deseado, mientras que la

fase móvil se encuentra en un estado líquido en donde las proteínas a analizar se encuentran disueltas (Cummins *et al.* 2011).

Tabla 5

Tipos de técnicas cromatográficas que se utilizan en la separación de una mezcla de proteínas. Tomado y modificado de Ritchie, 2012. Mayolo et al. (2012).

Tipo de Cromatografía	Separación en función de	Aspectos relevantes
De afinidad	Interacciones específicas	Se basa en la unión específica de un ligando a la matriz de la fase estacionaria. Este ligando se une específicamente a una proteína o a un grupo de proteínas, por lo que las últimas proteínas en eluir serán aquellas que tengan una interacción molecular con el ligando anclado a la fase estacionaria, para ello, es necesario agregar una solución amortiguadora que rompa la interacción de la proteína con el ligando.
De intercambio iónico	Carga neta superficial	Permite la separación de iones y moléculas polares en base a las propiedades de carga. La separación se lleva a cabo por las interacciones electrostáticas entre las proteínas y la fase estacionaria cargada. Existen dos tipos A) aniónica: fase estacionaria cargada positivamente, atrae moléculas con carga neta negativa. B) catiónica: fase estacionaria cargada negativamente, atrae moléculas con carga neta positiva. Para lograr que las proteínas eluyan, se disminuye (en aniónica) o aumenta (en catiónica) el pH de la fase móvil para que se rompan las interacciones con la fase estacionaria.

De fase
reversa

Hidrofobicidad

Está basada en la polaridad de las proteínas y de la matriz de la fase estacionaria. Para realizarla, las proteínas deben estar en una solución con una alta concentración salina (alta fuerza iónica), que provoca que su conformación se desnaturalice y queden expuestas las regiones hidrofóbicas, mismas que interactuarán con la fase estacionaria. Para conseguir la elución, se baja la cantidad de sales de la solución o fase móvil, lo que provocará que las proteínas adquieran su forma nativa y migren de la columna.

De exclusión
molecular

Peso molecular (radio
hidrodinámico)

La fase estacionaria consta de materiales porosos que excluirán o incluirán moléculas de acuerdo al radio hidrodinámico, es decir, el volumen que ocupa una molécula en solución, éste define la capacidad de penetrar o no los poros de la fase estacionaria. El radio hidrodinámico de una molécula está dado por su tamaño y forma. Así, las proteínas de mayor tamaño eluyen más rápido porque no pueden penetrar los poros de la matriz y tienen un camino directo por la columna, mientras que a las más pequeñas les lleva más tiempo eluir por dichos poros.

De esta manera, el tipo de técnica cromatográfica que se elija estará en función del tipo de proteínas que se quieran separar. Así, cualquiera que sea la cromatografía empleada, el paso posterior a la separación corresponde a la obtención de un cromatograma. Los cromatogramas son representaciones gráficas de la señal detectada en función del tiempo desde que la muestra es inyectada al sistema cromatográfico, y hasta que esta eluye completamente, generando así un patrón de “picos” que se representan a manera de un gráfico estilo Gaussiano y que corresponden a los péptidos que han sido aislados, para así continuar con la identificación por espectrometría de masas (Reyes, 2018. Medina, 2013).

La cromatografía es una familia de técnicas con una amplia gama de posibilidades en la separación de proteínas. En proteómica, se utilizan tanto para la separación de proteínas, como de péptidos, siendo esta última la ocupada con más frecuencia. De esta manera, se pueden combinar diferentes tipos de cromatografía empleando las diferentes propiedades físico-químicas previamente descritas, esto mediante la variación de la fase estacionaria y la fase móvil. Generalmente, la parte final de esta combinación de técnicas incluye la cromatografía líquida de fase reversa. El acoplamiento de este tipo de cromatografía con un espectrómetro de masas recibe el nombre de CL-EM o HPLC-MS (High pressure liquid chromatography, por sus siglas en inglés). En esta configuración, los péptidos eluidos del cromatógrafo son casi instantáneamente ionizados, introducidos, aislados y analizados en un espectrómetro de masas, obteniendo así un cromatograma y los respectivos espectros de masas de las proteínas o péptidos de la mezcla analizada (Medina, 2013).

1.5.4.1. *Electroforesis monodimensional*

La electroforesis ha sido una de las técnicas más utilizadas en la separación de proteínas, esta se basa en la migración a través de geles de poliacrilamida debido a las propiedades físico-químicas de su carga y peso molecular (Medina, 2013).

Existen esencialmente dos tipos de electroforesis. La electroforesis monodimensional (1-DE) y la bidimensional (2-DE).

En la electroforesis monodimensional, la separación de las proteínas se da únicamente en función de su peso molecular. Para ello, es necesario que después de la extracción de proteínas provenientes de la muestra, se haga una mezcla con un amortiguador conocido como “Amortiguador Laemmli”, que ayudará, por sus propiedades químicas, a que las proteínas migren por el gel de poliacrilamida, logrando separar proteínas de entre 10 y 300 KDa (Medina, 2013., Morales y Gallo, 2006).

Como se puede ver en la Tabla 6, los compuestos del amortiguador Laemmli cumplen funciones de alta importancia en la separación de proteínas. Uno de los agentes más relevantes en esta mezcla es el dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), ya que desnaturaliza las proteínas y hace que pierdan su forma nativa, no obstante, este detergente se adhiere a los aminoácidos en proporción constante (aproximadamente cada dos AAs), logrando así cargar negativamente a la proteína. La unión SDS-proteína se conoce como unión “rod-like” (forma de varilla), siendo la longitud de esta varilla la que determinará la migración de la proteína, pues estará en función de la fricción que ésta ejerza respecto a los estrechos poros de la acrilamida (Medina, 2013).

Tabla 6
Composición química del amortiguador Laemmli y funciones que lleva a cabo cada compuesto.

Compuesto	Función
Glicerol	Ayuda a que la adición de las proteínas en los pozos de los geles sea eficiente, pues su densidad contribuye a que la muestra no se disperse

TRIS-HCl	Es propiamente el tampón. Mantiene a las proteínas en un pH de entre 7 y 9
SDS	Rompe enlaces no covalentes en las proteínas, provocando su desnaturalización y que pierdan su formación nativa
Agua	Es el disolvente por excelencia
Azul de Bromofenol	Es el colorante que ayudará a ver el seguimiento de la electroforesis (el desplazamiento de las proteínas a través del gel durante la aplicación de carga eléctrica)
*β-Mercaptoetanol	Ayuda a eliminar los puentes disulfuro para evitar la formación de estructuras secundarias / terciarias. Por lo que favorece la desnaturalización.

Nota: Trishidroximetilaminometano – ácido clorhídrico (TRIS-HCl), Dodecil sulfato de sodio (SDS), por sus siglas en inglés.

* El β-Mercaptoetanol no es parte del amortiguador Laemmli, sin embargo, una vez que se hace la mezcla de amortiguador y la muestra de proteínas, se agrega este último reactivo para favorecer la desnaturalización.

Una de las aplicaciones más comunes de este tipo de electroforesis es la caracterización de proteínas después de una purificación de las mismas (separación de proteínas respecto al resto del contenido celular, tisular, etc.), por ello, a este tipo de geles se les puede llamar “geles de integridad” (Morales y Gallo, 2006).

1.5.4.2. Electroforesis Bidimensional (2DE SDS-PAGE)

Por otro lado, la electroforesis bidimensional es una de las técnicas de separación con mayor resolución, pues permite que se puedan analizar múltiples proteínas en una misma corrida. Para lograrlo, la electroforesis 2-DE utiliza dos parámetros ortogonales: el isoelectroenfoco (IEF, por sus siglas en inglés) y la electroforesis por gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) siendo estas la primera y segunda dimensión respectivamente (Friedman et al. 2009).

La mayoría de los experimentos 2-DE comienzan con el IEF, que corresponde a una técnica electroforética que es capaz de separar las proteínas en función de su carga neta. Para ello, es necesario comprender que las proteínas son moléculas anfotéricas, es decir, que pueden comportarse como ácido o como base. Algunos autores las llaman anfipróticas, dado que tienen sitios especiales para aceptar protones. Estos sitios se pueden encontrar en las aminas libres y en los ácidos carboxílicos, por lo que están en los extremos terminales de los aminoácidos. De igual manera, se pueden encontrar en las cadenas laterales de AAs específicos, como la arginina, la lisina e histidina, así como los ácidos glutámico y aspártico. Con lo anterior, queda claro que la carga neta de la proteína está dada en función de su composición de aminoácidos y del pH del ambiente en el que se encuentra (Földi, 2011).

Al ser las proteínas moléculas anfotéricas, poseen una propiedad fisicoquímica denominada punto isoeléctrico (pI), que se define como el pH en el que la carga neta de la proteína es igual a cero, es decir, es neutra. Ésta propiedad es de suma importancia en la separación, pues aquellas proteínas cuyo pI esté en la parte ácida (de 6.9 hacia abajo en la escala de pH) estarán cargadas positivamente, mientras que las que se localicen en la parte básica (7.1 hacia arriba en la misma escala) tendrán una carga neta negativa (por lo que migrarán hacia cátodo y hacia el ánodo, respectivamente). La influencia de un campo eléctrico hará que las proteínas migren hacia el lado opuesto de su carga neta hasta detenerse en el pH en el que su carga neta sea de cero (Földi, 2011).

Éste técnica introducida en 1967, concentra a las moléculas anfotéricas en segmentos con rangos de pH específicos y proporciona la ventaja de lograr una alta resolución durante el fraccionamiento, mientras simultáneamente es capaz de concentrar la muestra. El principio algebraico de la carga neta consiste en la suma de todas las cargas positivas y negativas de los aminoácidos de la proteína o péptido. De esta manera, durante la migración, las proteínas / péptidos ganan o pierden protones hasta alcanzar su pI , consiguiendo equilibrio y concentrándose en ese punto específico del gradiente de pH. Sin embargo, algunos péptidos siguen migrando hacia regiones de pH muy alto, pero la protonización comienza de nuevo y hace que migren nuevamente hacia el cátodo hasta llegar nuevamente al valor del pI (Ciborowsky y Silberring, 2016).

El gradiente de pH anteriormente mencionado es generado por anfólitos (ácidos o bases débiles) de carga, que generalmente están ancladas a un soporte de poliacrilamida, éstas reciben el nombre de *Immobilized pH Gradients* o IPGs, por sus siglas en inglés (Medina, 2013). Así, las IPGs son derivados de poliacrilamida químicamente bien definidos que presentan grupos amino y carboxilo que pueden formar una serie de amortiguadores con diferentes valores de pK_a entre 1 y 13, generando gradientes de pH muy estables y permitiendo que los experimentos sean reproducibles y que se alcance el pI de cada proteína realmente (Görg *et al.* 2009). Posteriormente, éstas tiras, ya con las proteínas separadas por carga, se correrán en una nueva electroforesis pero ésta vez con la segunda dimensión SDS-PAGE, en donde se separarán en función de su peso molecular de la misma manera que en la electroforesis monodimensional (Medina, 2013).

La Fig. 6 muestra una representación esquemática de cómo se realiza la electroforesis en segunda dimensión.

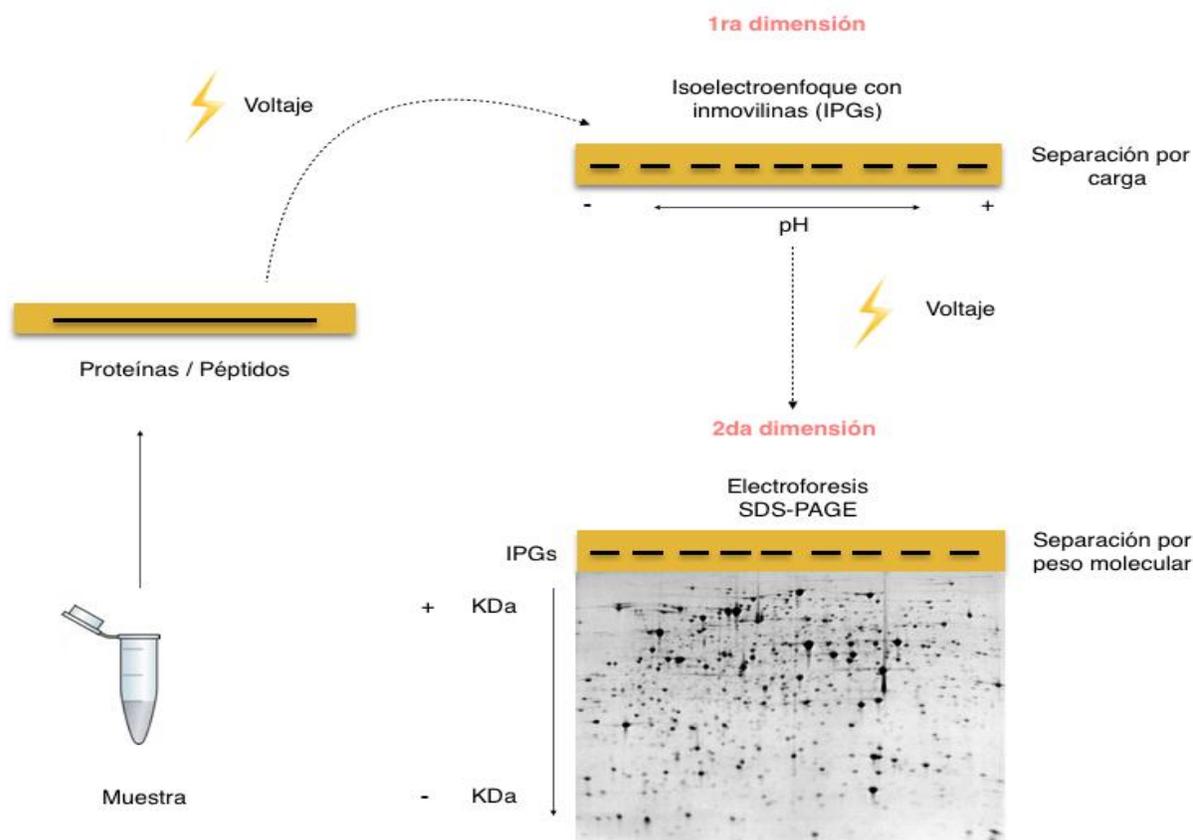


Figura 6: Electroforesis en segunda dimensión (2-DE SDS-PAGE). Se pueden observar ambas dimensiones y el principio por el cual se separan las proteínas en cada una de ellas. KDa: Kilodaltones, unidad del peso molecular de las proteínas.

1.6. Métodos de identificación de proteínas

1.6.1. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que permite el estudio de múltiples moléculas en un amplio rango y en un mismo experimento, contando con una alta sensibilidad y especificidad molecular. Ésta herramienta de alta tecnología ha cobrado gran importancia en los estudios de proteómica y del análisis de tejidos en general (Norris y Caprioli, 2013), volviéndose uno de los métodos de estudio más usados en la identificación de proteínas (Dunham *et al.* 2012). Cuando la EM se combina con un método de separación, como la cromatografía o la electroforesis, permite analizar e identificar las moléculas que existen en mezclas biológicas (Lemma-Gray *et al.* 2008). Dicha técnica se realiza mediante el análisis

de la muestra en un espectrómetro de masas, que es un instrumento que mide las masas individuales que han sido convertidas en iones mediante un ionizador. Así, el espectrómetro de masas no mide la masa molecular, sino la relación masa / carga (m/z) de los iones que componen un analito, generando así un espectro de masas (Plascencia, 2003). El espectro de masas de cada proteína puede mostrar cualquier variante en la secuencia, las MPTs y las degradaciones por proteasas (Camprubí-Rimblas *et al.* 2015).

Por ello, el uso de la espectrometría de masas ha permitido poder estudiar el proteoma de diferentes fuentes biológicas para estudiar condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Cho, 2007).

Existen diferentes formas de llevar a cabo la espectrometría de masas, en las que se debe ver el tipo de muestra, de equipo de ionización, de detector y de enfoque. A continuación, se mencionan algunas de las variantes en la técnica.

1.7. Métodos de ionización

Una parte crucial en la identificación mediante espectrometría de masas reside en el método de ionización empleado, pues es el que ayudará a obtener la relación m/z y, con ello, el espectro de masas con el que se trabajará. Existen diversos métodos de ionización, entre ellos el ESI (Electro Spray Ionization), MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) y SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization), que han permitido introducir proteínas de más de 1 millón de Daltones en espectrómetros de masas como iones estables en fase gaseosa (Plascencia, 2003).

1.7.1. Ionización por MALDI-TOF

La Ionización / Desorción Asistida por Matriz (MALDI) ha sido uno de los métodos mayormente usados desde su invención, principalmente en el estudio de biomoléculas de cadena larga como las proteínas. Para lograrlo, se introduce la

muestra a una matriz de metal, la cual contiene moléculas que interactuarán con el analito para generar una mezcla sólida que las mantendrá intactas hasta su conversión a fase gaseosa. Posterior a ello, se llevan al espectrómetro de masas, en donde la mezcla sólida es estimulada mediante la emisión de luz UV a una longitud de onda de entre 355 a 337 nm. La luz UV es absorbida por la matriz, provocando un aumento en su temperatura y que la fase sólida se convierta en fase gaseosa por la desorción de iones, los cuáles pasarán a un analizador (generalmente TOF: *Time of flight*, por sus siglas en inglés) en donde se medirá el tiempo en el que tardan en llegar desde que se generan, hasta que llegan al detector, el cual generará el espectro de masas. Así, los iones más pequeños tendrán un tiempo de retención menor en la matriz, mientras que los más grandes tardarán más y esto se notará en el espectro de masas, que arrojará un gráfico específico para cada ion, para finalmente ser comparado con las bases de datos para conocer su identidad (I-Chung et, al. 2015).

1.8. Aproximaciones analíticas de la proteómica mediante la Espectrometría de masas

Existen dos enfoques o aproximaciones analíticas de la EM que se aplican en la proteómica, los cuáles se explican en la Figura 7.

La primera de estas aproximaciones corresponde al “Top – Down” proteomics (de arriba abajo) en donde las proteínas se analizan de manera íntegra, es decir, sin que haya una previa digestión enzimática que las divida en péptidos. De esta manera, las proteínas se separan directamente mediante geles o por CL y posteriormente se analizan mediante EM (Zachery *et al.* 2014). Este enfoque presenta la ventaja de que la bioquímica de las proteínas queda intacta, así como sus características y modificaciones, lo que permite una selectividad mayor (Wright *et al.* 2012).

En cuanto al “Bottom – Up” proteomics (de abajo hacia arriba) las proteínas se analizan mediante EM con una previa digestión, es decir, se analizan como péptidos, que serán usados para inferir la identidad, cantidad y las modificaciones

que presentan las diferentes proteínas de la muestra de interés. La digestión de las proteínas se puede realizar de dos maneras. Una de las opciones es hacer una disolución que contenga la muestra y una proteasa, como la tripsina. De esta manera, los péptidos resultantes son separados mediante CL de dos dimensiones, que se basa en la hidrofobicidad y en la carga (fase reversa e intercambio iónico, respectivamente). La segunda opción corresponde a la separación de la proteínas mediante geles, en el cuál se genera un patrón de bandeos y las bandas de interés se sacan del gel para su posterior digestión con tripsina, que genera péptidos que se separan usando la fase reversa de la CL. Finalmente, los péptidos separados son ionizados e introducidos al espectrómetro de masas (Zachery *et al.* 2014).

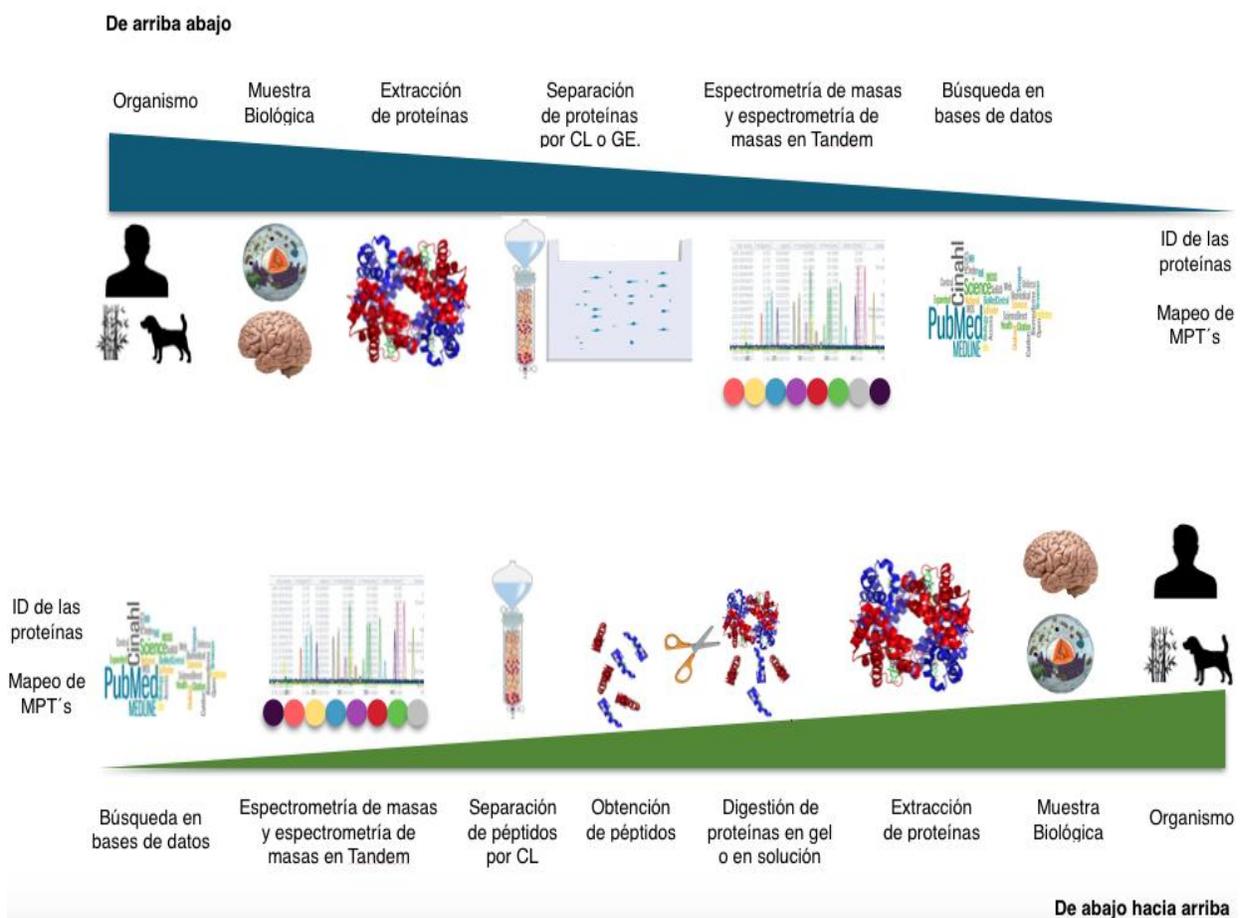


Figura 7. Enfoques de la EM aplicada a la proteómica. Arriba, se observa el enfoque de arriba abajo (top-down). Debajo, se muestra el enfoque de abajo hacia arriba (bottom-up). Ambas comienzan desde la extracción de la muestra y terminan con el análisis en bases de datos. Tomado y modificado de Zachery *et al.* (2014).

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó un enfoque Bottom – Up (B-U) dado que ofrece algunas ventajas extra en aspectos como la identificación de proteínas, pues la estrategia es más robusta y de alto rendimiento, sumado a que las herramientas bioinformáticas actualmente disponibles son mejores. En cuanto a la modificación de proteínas, el enfoque “Top – Down” es más eficaz, pues puede brindar información a la vez de muchas de las MPTs de las proteínas contenidas en la muestra, por supuesto con una previa purificación de las mismas para realizar análisis de EM más específicos. En la otra cara de la moneda, el enfoque B-U permite analizar también las MPTs, sin embargo, suele perderse información en cuanto a la conectividad de las mismas por la pérdida peptídica que se da por la preparación y la digestión enzimática (Zachery *et al.* 2014).

Para ello, las diferentes proteínas, provenientes de una muestra biológica, pasan por un espectrómetro de masas que, de manera general, mide la relación masa / carga (m/z) de las moléculas en fase gaseosa. Para conseguir tal relación y la futura identificación de las moléculas mediante la EM, esta técnica analítica se divide en dos pasos de acuerdo a Dunham *et al.* 2012.

1.- Espectrometría de masas (EM): Se hace un análisis de la mezcla de péptidos digeridos, que produce la relación m/z de cada péptido y su abundancia relativa, que es aproximadamente proporcional a la intensidad de señal para el mismo péptido a lo largo de diferentes muestras.

2.- Espectrometría de masas en Tandem (EM/EM): Se aíslan los péptidos de interés, que generalmente están basados en la abundancia resultante del análisis por EM, los cuáles se fragmentan y se obtiene una relación m/z , con la que después se hace uso de programas informáticos especializados para deducir la secuencia de AAs del péptido original, para después hacer la reconstrucción de la composición proteica de interés, esto basado en los patrones teóricos de fragmentación *in silico*.

II) Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar las diferencias en el perfil proteómico de la corteza prefrontal dorsolateral en sujetos con causa de muerte por suicidio consumado al compararlo con el perfil de individuos que murieron por otras causas.

2.2. Objetivos particulares

En la corteza prefrontal dorsolateral:

1. Identificar las proteínas diferencialmente expresadas entre individuos con causa de muerte por suicidio y sujetos con causa de muerte diferente al suicidio.
2. Identificar las principales vías biológicas asociadas a las proteínas cuyo perfil se encuentra alterado en sujetos con causa de muerte por suicidio .

III) Justificación

La muerte por suicidio en población juvenil mexicana ha presentado un rápido y alto crecimiento en los últimos años, por lo que estudiar los mecanismos bioquímicos involucrados en este fenómeno podría brindar información para comprender los posibles cambios que ocurren a nivel cerebral y, con ello, ayudar en el futuro diagnóstico y pronóstico del mismo.

IV) Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en el perfil proteómico de la corteza prefrontal dorsolateral en sujetos con muerte por suicidio en comparación con sujetos que murieron por una causa diferente al suicidio?

V) Hipótesis

El perfil proteómico de la corteza prefrontal dorsolateral en sujetos con muerte por suicidio será diferente al perfil de los sujetos que murieron por una causa distinta al suicidio.

VI) Diseño de estudio

- El presente trabajo es un estudio de tipo observacional, comparativo y transversal.

6.1. Selección de muestras

El muestreo no fue aleatorio y se realizó por conveniencia. Las muestras utilizadas en este estudio fueron obtenidas a través del Instituto Nacional de Ciencias Forenses (INCIFO). Para su uso como parte de este estudio, se tomaron en cuenta los siguientes criterios de selección.

6.2. Criterios de inclusión para casos

- Causa de muerte por suicidio
- Muestras provenientes de individuos masculinos
- Que las muestras provinieran de individuos entre 25 y 45 años

6.3. Criterios de exclusión para casos

- Las muestras recolectadas en un periodo mayor a 24 horas posteriores a la muerte no fueron consideradas para su análisis
- Se omitieron aquellas muestras cuya cantidad de tejido era insuficiente para el estudio o que presentaron alteraciones visibles

6.4. Criterios de inclusión para controles

- Se usaron muestras cuyas edades eran similares a las de los casos
- Que el mecanismo de muerte fuera igual o similar al de los casos

- Muestras provenientes de individuos masculinos con muerte diferente al suicidio

6.5. Consideraciones éticas

Todos y cada una de los procedimientos de este trabajo fueron aprobados por el comité de bioética de investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

VII) Materiales y Método

7.1. Tejido cerebral

Se trabajó con muestras de tejido cerebral criopreservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, que fueron obtenidas del Laboratorio de Genómica de las Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), a través del Instituto Nacional de Ciencias Forenses (INCIFO). La toma de muestra la realizó un histopatólogo usando como guía mapas neuroanatómicos, en donde los puntos de referencia fueron la segunda circunvalación prefrontal y el giro precentral. Así, se lograron extraer 5 cm^3 de tejido cerebral correspondiente al área de Broadman 9, localizada en la corteza prefrontal dorsolateral, los cuáles se almacenaron en tubos de criopreservación libres de contaminantes y degradantes biológicos. Esta muestra se distribuyó para distintos análisis entre los que destaca el del presente trabajo.

Se usaron 5 muestras de casos y 4 de controles con los siguientes datos clínicos y sociodemográficos (Tabla 7).

Tabla 7*Claves de registro, tipo de muerte y los datos*

Muestra	Tipo de muerte	Género	Edad
Control 1	Punzocortante de tórax	Masculino	30
Control 2	PAF en tórax	Masculino	26
Control 3	PAF en tórax	Masculino	35
Control 4	Asfixia por broncoaspiración	Masculino	33
Caso 1	Ahorcamiento	Masculino	26
Caso 2	Ahorcamiento	Masculino	29
Caso 3	Ahorcamiento	Masculino	35
Caso 4	Ahorcamiento	Masculino	39
Caso 5	Ahorcamiento	Masculino	45

Nota: PAF: Perforación por arma de fuego.

7.2. Disgregación del tejido cerebral

Se pesaron las muestras cerebrales, con valores promedio entre 0.5 y 1 gramo. Posterior a ello y se introdujeron en tubos para centrífuga (marca Eppendorf) de 5 mL. Se hicieron los cálculos correspondientes para agregar el volumen necesario de amortiguador DIGE (Urea 7M, Tiourea 2M, TRIS 30 mM y CHAPS 4%, pH 8.5), cuya relación fue 3:1 (3 mL del amortiguador por cada gramo de tejido cerebral). Se maceró la muestra manualmente con ayuda de pistilos de plástico con el fin de tratar de homogeneizar el tejido con el amortiguador. Para asegurar el lisado de las células, las muestras se sometieron a un proceso de ruptura celular mediado por vibraciones de ultrasonido, proceso que recibe el nombre de “sonicación”. Esto se realizó 5 veces a una frecuencia de 60 Hz (amplitud 30%) durante 15 segundos de exposición a ondas y 1 minuto de descanso entre cada pulso (con el fin de no

calentar la muestra para que no se desnaturalizaran las proteínas). Una vez concluida la sonicación, se almacenó la muestra a -20 °C.

7.3. Extracción de proteínas y estandarización para la selección del amortiguador de resuspensión

Una vez realizada la ruptura del tejido y con los compuestos celulares descartados, se separaron las proteínas del resto de las biomoléculas presentes en la muestra. Para ello, se tomaron 300 µL de la muestra lisada y se adicionaron 900 µL de metanol y 300 µL de diclorometano. Después, se centrifugaron a 12,000 revoluciones por minuto durante un lapso de 20 minutos a 4°, esto con el fin de generar una separación en dos fases: una acuosa y una sólida. Concluida la centrifugación, se retiró la fase acuosa y se conservó la fase sólida con todo el contenido proteico. Posteriormente, se agregaron 900 µL más de metanol y se centrifugó nuevamente durante 2 minutos, con el fin de lavar lo más posible el sedimento. Finalmente, se quitó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento, resuspendiendo este último en 1.5 mL de amortiguador Tris-HCl pH 7.4 50 mM para usar únicamente el volumen necesario por experimento y almacenarlo a -20°C para su preservación. Previo a este paso, se hizo la estandarización para conocer el mejor amortiguador para la re suspensión de las proteínas. Se probaron los diferentes amortiguadores utilizando 1.5 mL de cada uno hasta obtener el mejor resultado en cuanto a solubilidad.

7.4. Cuantificación de proteínas por el método Lowry modificado

Se realizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para determinar la concentración de proteínas en los extractos de cerebro. Para esta técnica, se probaron 10 concentraciones de BSA (de 0 a 100 µg), y se añadieron los reactivos que aparecen en la Tabla 8, los cuales son necesarios para generar una reacción colorimétrica que se leyó en el espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro de Amersham Biosciences a una longitud de onda de 750 nm.

Tabla 8.

Cantidades y reactivos necesarios para hacer la curva para la determinación de proteína en el extracto de tejido cerebral.

Tubo	Agua	BSA [1 µg/ µL]	Muestra	NaDOC	Reactivo A	Reactivo B
1	0.45 mL	–	–	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
2	0.45 mL	10 µL	–	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
3	0.45 mL	20 µL	–	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
4	0.45 mL	50 µL	–	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
5	0.45 mL	100 µL	–	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
6	0.45 mL	–	3 µL	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
7	0.45 mL	–	6 µL	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL
8	0.45 mL	–	9 µL	0.1 mL	0.5 mL	0.25 mL

Nota: La curva de BSA va de los 0 a los 100 µg. El tubo 1 corresponde al blanco para calibración del espectrofotómetro. Los tubos 6, 7 y 8 denotan la cantidad necesaria de la muestra a la que se le determinará la concentración para la curva, se usan diferentes cantidades con el fin de encontrar la concentración cuya absorbancia se encuentren dentro de los límites de la curva patrón de BSA.

NaDOC: Desoxicolato de Sodio. Reactivo A: Agua, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Hidróxido de Sodio (NaOH) y solución de carbonato-tartrato-cobre (CTC). Concentración por reactivo: Partes iguales de cada reactivo. Reactivo B: Agua y Fenol Folin-Ciocalteous (F-C). Concentración: 1 volumen de F-C por 5 volúmenes de agua.

Una vez agregados los reactivos a las muestras, se hizo la lectura en el espectrofotómetro y se obtuvo la curva de concentración de proteína. Como se puede observar en la Tabla 8, cada muestra se hizo por triplicado a tres concentraciones diferentes (3, 6 y 9 µL) con el fin de tomar los valores de absorbancia de las tres concentraciones y generar un promedio en cuanto a su rendimiento.

Posteriormente, se sacaron los cálculos correspondientes utilizando la ecuación de la recta, que se muestra en la Fig. 8, para determinar la cantidad de proteína a cargar en los geles.

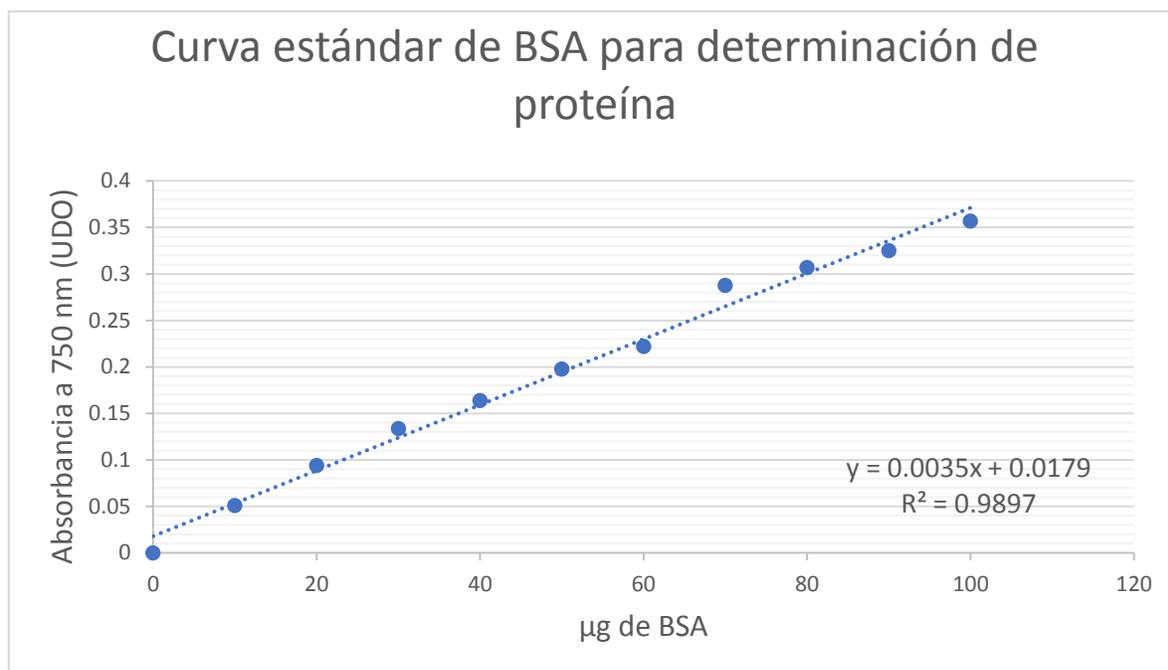


Figura 8. Curva estándar de BSA para determinación de proteína. Con base en ella y en la ecuación de la recta obtenida que se muestra en la parte inferior derecha, se hicieron los cálculos correspondientes para cargar la proteína en los geles de acrilamida. UDO: Unidades de densidad óptica.

La Fig. 8 muestra la regresión lineal aplicada a los datos de las absorbancias obtenidas a 750 nm a cantidades gradualmente mayores de la proteína BSA. Como se puede observar, la línea media resume la dependencia entre la variable endógena (absorbancia) en el eje de las “Y”, y la variable exógena (concentración de BSA) en el eje de las “X”.

El coeficiente de determinación (R^2) obtenido es mayor a 0.95, teniendo este un valor de 0.9897, es decir, el 98.97% de la variabilidad de Y es explicada por la variabilidad de X. Lo anterior indica que el modelo ajustado es capaz de explicar la relación absorbancia *versus* concentración, a saber, que a mayor concentración de BSA, mayor será, en proporción a la misma, la absorbancia obtenida, propiciado así la predicción de valores futuros de absorbancia según los valores de

concentración de BSA, indicando que los datos satisfacen las condiciones de linealidad de la regresión.

7.5. Separación de proteínas por electroforesis monodimensional

Se prepararon los geles de poliacrilamida para la electroforesis monodimensional. Para su montaje, se usó el paquete de BioRad Mini-PROTEAN® Tetra Cell Handcasting accessory kit, que incluye la cámara de electroforesis vertical para mini geles de 1 mm. Los geles al 12% de acrilamida se hicieron con el paquete de BioRad TGX stain-free™ FastCast™ acrylamide kit, usando los reactivos y cantidades que se presentan en la Tabla 9.

Primero se agregaron al equipo de montaje de geles los reactivos necesarios para elaborar el gel separador, además de una fina capa de agua al final para evitar el contacto con oxígeno del medio exterior y propiciar que se generara una superficie recta y sin bordes, ésta capa se quitó una vez polimerizado el gel. Posteriormente, se agregaron los reactivos necesarios para hacer el gel concentrador, colocando en seguida el peine para la formación de pozos y se esperó a que polimerizara. Después de lo anterior, se quitó el peine del gel y se lavaron los pozos con amortiguador para electroforesis 1X TRIS /Glycine / SDS de BioRad. El proceso de elaboración de geles se muestra en la Fig. 9.

Una vez conocida la cantidad de proteína a cargar y con los geles elaborados, se agregó a cada muestra el volumen necesario de amortiguador de corrida o buffer Laemmli (4X Laemmli Sample Buffer de BioRad), cuya composición es Glicerol 75%, TRIS-HCL 0.5 M, SDS 10%, azul de bromofenol 0.02% y agua. En cada pozo se corrieron 10 µL, los cuales se repartieron entre el amortiguador Laemmli y la muestra resuspendida en TRIS, con el volumen necesario según la concentración de proteína de cada muestra.

Tabla 9

Reactivos necesarios para realizar un gel de poliacrilamida al 12% en mini geles de 1 mm

Reactivos para gel separador	Reactivos para gel concentrador	Reactivos de las soluciones y función
3 mL del <i>resolver</i> A	1 mL del <i>stacker</i> A	Acrilamida, agente que será polimerizado para formar la matriz por la cuál migrarán las proteínas
3 mL del <i>resolver</i> B	1 mL del <i>stacker</i> B	Bis-acrilamida, que formará cruces al azar para que los monómeros de acrilamida formen la matriz
30 μ L de PSA al 10%	10 μ L de PSA al 10%	Persulfato de amonio y agua. El radical persulfato activa al TEMED para que comience la reacción de polimerización de la acrilamida
3 μ L de TEMED	2 μ L de TEMED	Tetrametiletilendiamina, que ayuda a la polimerización de la acrilamida y le brinda estabilidad al unirse con iones metálicos como iones cobre

Nota: Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros. Los reactivos se agregaron en el orden que están en la tabla, formando una mezcla lista para agregar al equipo de montaje de geles.

Una vez conocida la cantidad de proteína a cargar y con los geles elaborados, se agregó a cada muestra el volumen necesario de amortiguador de corrida o buffer Laemmli (4X Laemmli Sample Buffer de BioRad), cuya composición es Glicerol 75%, TRIS-HCL 0.5 M, SDS 10%, azul de bromofenol 0.02% y agua. En cada pozo se corrieron 10 μ L, los cuales se repartieron entre el amortiguador Laemmli y la muestra resuspendida en TRIS, con el volumen necesario según la concentración de proteína.

Cada muestra se añadió en un pozo del gel de poliacrilamida, siendo el del primer carril el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope® de BioRad). Se aplicó un voltaje inicial de 30 volts (V) durante un tiempo aproximado de 30 minutos o hasta que el frente de corrida (visible por el amortiguador Laemmli) pasara del gel concentrador al gel separador. Posteriormente, se aumentó de manera gradual el voltaje en 15 V cada 15 minutos hasta alcanzar un voltaje final de 150 V y se mantuvo constante hasta que el frente de corrida saliera del gel separador, esto en un tiempo aproximado de 60 minutos.

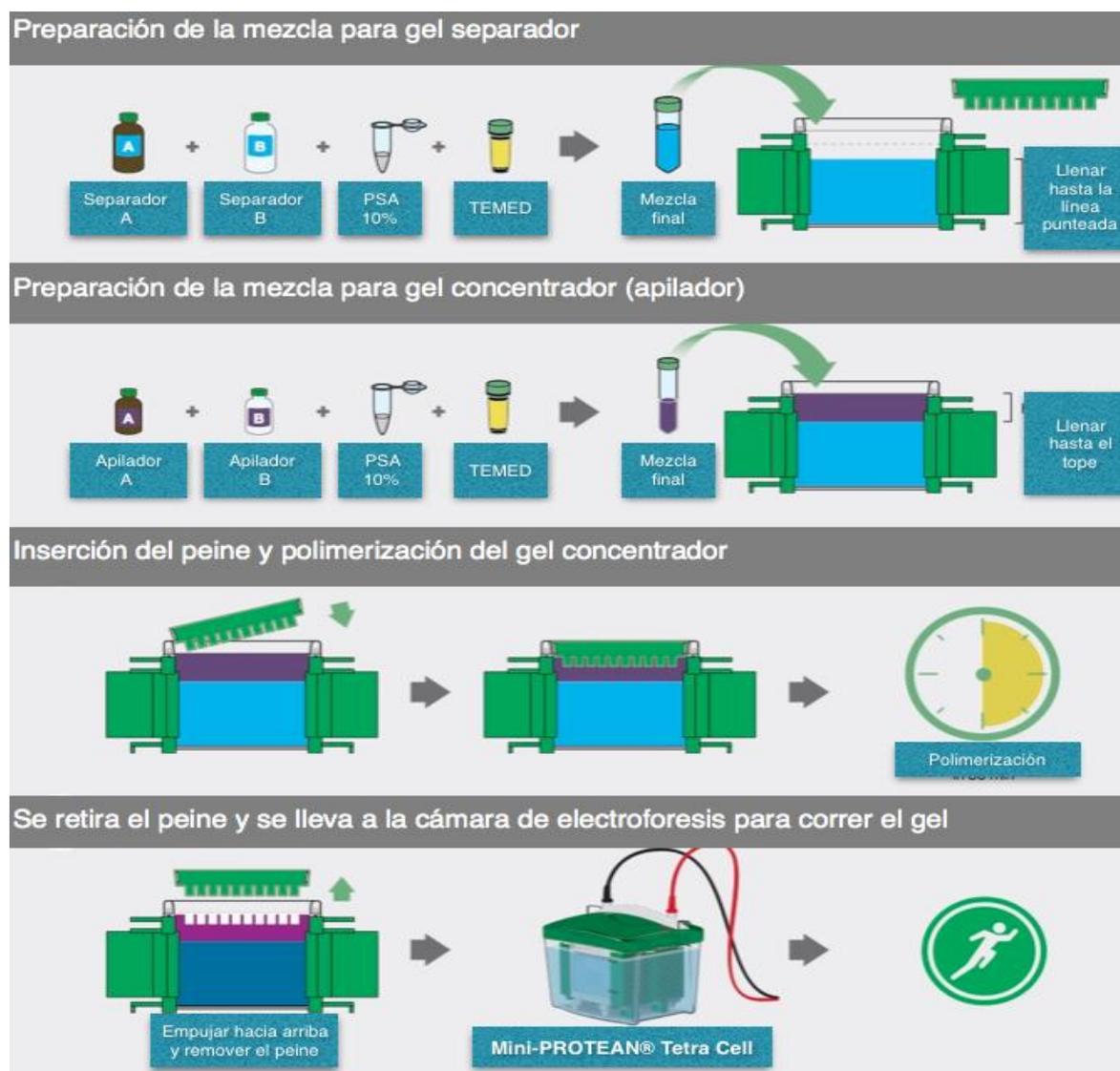


Figura 9. Pasos que seguir para elaborar los geles de poliacrilamida (Tomado y modificado de: BioRad, desde <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10042306.pdf>, 2018).

7.6. Tinción de geles con Coomassie

Para la visualización de las bandas de proteína, se tiñeron los geles usando el colorante Coomassie R-350 (PhastGel™ Blue R, de GE Healthcare). Para su preparación, se disolvió una tableta en 80 mL de agua destilada, proceso que duró 10 minutos en continua agitación. Se agregaron 120 mL de metanol y se filtró con papel filtro. Esta solución estaba al 0.02%, pero se usó al 0.01% al mezclar una parte de la original con metanol, ácido acético y agua destilada en proporción 3:1:6 respectivamente. Se colocó el gel en un recipiente y se agregó el colorante hasta que cubriera todo el gel, dejándolo así toda la noche (a 4^o C) para conseguir una buena tinción. Al otro día, se quitó el Coomassie del gel y se agregó solución desteñidora (10% de ácido acético en agua/metanol 1:1), manteniendo el gel en constante agitación hasta lograr visualizar bandas bien definidas.

7.7. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional: Isoelectroenfoque

Una vez conocida la integridad de las proteínas mediante los geles monodimensionales, se realizó la electroforesis bidimensional, separando las proteínas en función de su punto isoeléctrico en la denominada primera dimensión o isoelectroenfoque. Para ello, primero se rehidrataron las tiras con gradientes de inmovilización de pH (IPGs, por sus siglas en inglés). Se utilizaron las Immobiline DryStrips (que se corrieron en el equipo Ettan™ IPGphor 3 de Amersham Biosciences GE, Healthcare) de 7 cm con un gradiente de pH de 4 a 7 en las que las proteínas se separaron en función de su *pI*. Estas tiras fueron expuestas a 125 µL de solución de rehidratación con composición Urea 8M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2% (Amersham Biosciences) y Dithiotreitol (DTT) 40mM y 100 µg de proteína. Las tiras se dejaron rehidratar a temperatura ambiente durante 10 horas, con previa aplicación de aceite mineral para evitar la evaporación del amortiguador y cuidando que no hubiera burbujas. El Isoelectroenfoque se llevó a cabo bajo las condiciones que se presentan en la Tabla 10.

Este procedimiento se realizó de acuerdo a los estándares del manual “2-D electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods” de Amersham Biosciences, GE Healthcare. Posteriormente, se almacenaron las tiras ya hidratadas a -70 ° C para su futuro uso en la separación SDS-PAGE.

Tabla 10

Condiciones del isoelectroenfoque aplicado a cada IPG.

Paso	voltaje (V)	voltaje/hora (V/h)	Condiciones finales
1	100	100	Número total de pasos: 6 pasos
2	300	200	Tiempo total: 4 horas
3	1000	300	Voltaje/hora total: 7100 Vh
4	5000	4500	Temperatura: 20 ° C
5	5000	2000	

7.8. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional: SDS-PAGE

Concluida la resolución por isoelectroenfoque, se separaron las proteínas en la segunda dimensión en función de su peso molecular. Para ello, se equilibraron las IPGs después de la electroforesis en primera dimensión, para introducir reactivos necesarios para la electroforesis SDS-PAGE. Con este fin, se utilizaron dos amortiguadores de equilibrio, cuyos componentes se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11*Contenido de la mezcla de equilibrio para las IPGs*

Reactivo	Concentración	Cantidad	Amortiguador	Función
TRIS-HCl	50 mM	10 mL	I y II	Ayuda a mantener las tiras en un rango de pH apropiado para la electroforesis. Agente desnaturalizante
Urea	6 M	72.02 g	I y II	Participa evitando la electroósmosis y mejora el paso de las proteínas de la primera a la segunda dimensión
Glicerol	30 %	69 mL	I y II	Desnaturaliza las proteínas y se une a ellas, cargándolas de manera negativa
SDS	2 %	4.0 g	I y II	Permite monitorear el avance de la electroforesis
Azul de bromofenol	0.002 %	400 µL	I y II	Preserva el estado completamente reducido de las proteínas desnaturalizadas y no alquiladas.
DTT*		100 mg	I	Alquila los grupos tiol de las proteínas para evitar la oxidación durante la electroforesis
Iodoacetamida*		250 mg	II	
Agua bidestilada		Aforar a 200 mL	I y II	

Nota: El DTT y la Iodoacetamida se agregan al final.

Primero, se pusieron las tiras en tubos individuales y se añadieron 10 mL del amortiguador de equilibrio I, cuyo componente a resaltar es el DTT, pues ayudó para la reducción de los grupos sulfhidrilo. Posterior a ello, se decantó el amortiguador I y se agregó el II, con la Iodoacetamida para alquilar los grupos sulfhidrilos. Cada paso se realizó durante 15 minutos en constante agitación.

Una vez equilibradas las tiras, se colocaron en geles de poliacrilamida al 12% de 1 mm de grosor, con las concentraciones descritas en el protocolo “2-D electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods” de Amersham Biosciences, GE Healthcare. De esta manera, se comenzó la separación de proteínas por peso molecular previamente descrita. Al igual que en la electroforesis monodimensional, todo se realizó con el amortiguador de corrida TRIS-Glycine-SDS de BioRad, usando el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope® de la misma marca. La corrida se realizó en una cámara de electroforesis Mini Protean Tetracell de BioRad, a un voltaje de 60 V los primeros 20 minutos, posterior a este tiempo, se corrió a 120V hasta completar la corrida.

7.9. Tinción de geles bidimensionales con Sypro Ruby

Posteriormente, los geles bidimensionales se tiñeron con el colorante Sypro™ Ruby de ThermoFisher scientific, obteniendo así una tinción fluorescente de alta sensibilidad. Para ello, se agregó solución mezcladora a los geles, la cual está compuesta por metanol (50%) y ácido acético (7%). Se agregaron 100 mL de dicha solución y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Después, se agregaron 60 mL del colorante Sypro™ Ruby y se dejó en agitación durante toda la noche. Al otro día, se retiró el exceso de colorante y se agregó a los geles la solución de lavado, compuesta por metanol (10%) y ácido acético (7%) durante 30 minutos en agitación. Finalmente, los geles ya teñidos se escanearon y digitalizaron en el fotodocumentador Universal Hood III de BioRad, a una longitud de onda de UV 300 nm. Todos los pasos de la electroforesis en segunda dimensión se realizaron por duplicado.

7.10. Análisis de imágenes en software PDQuest

Se analizó el perfil proteómico de los geles bidimensionales utilizando el software PDQuest versión 8.0.1. de BioRad. Las imágenes para analizar se recopilaron en el grupo *SUI* o en el grupo *CTRL*, esto de acuerdo con la naturaleza de la muerte del

individuo del que se obtuvo la muestra de tejido cerebral. Posteriormente, se hizo un gel maestro de cada muestra, es decir, una imagen virtual que resume la información de las réplicas experimentales de cada muestra. A continuación, se establecieron los criterios necesarios para determinar las identidades electroforéticas válidas, excluyendo así de este grupo aquellas manchas o puntos muy pequeños o muy tenues que podrían ser ruido de fondo debido a la tinción. Además, se observaron sus respectivas representaciones tridimensionales, notando que aquellas manchas con una representación tridimensional que terminaba curvada representaban una proteína, mientras aquellas con representaciones tridimensionales que terminaban en punta o planas no se consideraron entidades electroforéticas válidas. De esta manera, se obtuvo un número total de manchas o *spots* de cada gel maestro y se compararon entre ellos para obtener aquellas proteínas diferencialmente expresadas entre ambas condiciones mediante un valor de cambio.

7.11. Análisis estadístico

Se trabajó con los datos de intensidad de las manchas en los geles 2DE obtenidos del software PDQuest.

Utilizando Excel, se realizó la prueba de T (análisis univariado) con el fin de ver si existía diferencia entre la expresión de proteínas en las muestras de suicidio respecto a las muestras control y, con ello, tener el primer acercamiento con las proteínas candidatas.

Posteriormente, se elaboraron gráficos y otras pruebas para una representación más visual de dicha expresión diferencial. Se utilizó el software libre MetaboanalystR versión 4.0, actualizado y mantenido por Xia Lab, Universidad de McGill, Canadá. A pesar de que este software se especializa en el análisis de datos metabólicos, contiene un apartado para análisis estadístico capaz de correr datos proteómicos en función de la intensidad de los píxeles de los geles 2DE obtenidos

del software PDQuest.

Mediante este software, se hicieron diferentes pruebas y análisis. Primero, se hizo la normalización de los datos por el método de cuantiles, esto con el fin de transformar los valores de cada muestra para que resultaran en una idéntica distribución. También se obtuvo el valor de cambio (*fold change*) de la expresión de proteínas de las muestras de suicidio respecto a las muestras control, esto para ver cuáles de las proteínas candidatas presentaban un valor de cambio significativo. Lo anterior se obtuvo al dividir los valores de la expresión de cada proteína de las muestras de suicidio entre los valores de expresión de las proteínas de las muestras control y al sacar el logaritmo en base 2 de este resultado, con la fórmula $[(S/C)\log_2]$.

Posterior a ello, se realizó un diagrama de volcán para ver de manera gráfica la diferencia de expresión de proteínas. Además, se realizó un mapa de calor (*heatmap*), que sirve como una representación de la expresión diferencial de las proteínas. De la misma manera, se llevó a cabo el análisis de componentes principales (análisis multivariado) con el fin de evitar problemas de multicolinealidad entre los datos y observar de manera gráfica si existían diferencias entre ambas condiciones.

Finalmente, se seleccionaron las proteínas cuyo valor de cambio fue igual o mayor a ± 1.5 o con un valor de p menor a 0.05 ($\alpha < 0.05$) en la prueba T.

7.12. Identificación de proteínas por espectrometría de masas acoplada a MALDI - TOF / TOF

Se seleccionaron las identidades electroforéticas válidas diferencialmente expresadas entre ambas condiciones, las cuáles fueron cortadas manualmente de los geles 2DE. Una vez separadas las manchas de los geles, se deshidrataron, destiñeron y liberaron de contaminantes con ACN: NH_4HCO_3 50 mM (v/v). Posteriormente, se hizo la digestión proteica, la cual se llevó a cabo durante 18 horas a 37° C con tripsina (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos

de la digestión (ACN: H₂O: CH₂O₂ en proporción 50: 45: 5, respectivamente). A continuación, se disminuyó el volumen de la muestra utilizando el concentrador Eppendorf 5301 y se desaló la muestra mediante la columna Zip TipC18 de Millipore.

La muestra se colocó por sextuplicado en la placa, utilizando como matriz α -ciano y se analizaron en un MALDI-TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos, se realizó un seguimiento con el algoritmo de búsqueda Paragon del software Protein Pilot con un porcentaje de confianza del 66%.

7.13. Análisis de vías biológicas

Se realizó el análisis de vías para ver la implicación de las proteínas candidatas en diferentes aspectos de relevancia biológica.

Lo anterior se consiguió mediante el software libre String versión 10.5, de ELIXIR (consorcio Europeo), en donde se metieron los datos obtenidos en el apartado 8.12 con la nomenclatura de UniProt (también del consorcio ELIXIR). Posteriormente, dicho software realizó una red de interacción de las proteínas (sustentándose en la base de datos que contiene) y se escogieron las dos vías con más proteínas candidatas involucradas y que presentaran un valor pequeño de radio de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) con el fin de evitar errores del tipo I en el rechazo de hipótesis nula, es decir, para evitar reportar falsos positivos.

VIII) Resultados

8.1. Extracción de proteínas y estandarización para amortiguador de resuspensión

La resuspensión de proteínas es una parte crucial en el desarrollo de este tipo de trabajos, por ello se probaron diferentes amortiguadores para su almacenaje. La elección del amortiguador se hizo con base en los resultados que se muestran en la Tabla 12. Como se puede observar, la cantidad máxima de amortiguador agregada al botón de proteínas (fase sólida) es de 1.5 mL, volumen que para el caso del PBS no fue suficiente, ya que ambas fases estuvieron siempre separadas y no se consiguió la homogeneización, por lo cual se descartó. Posteriormente, el amortiguador DIGE presentó una buena solubilización, sin embargo, contiene urea y tiourea, que son compuestos ópticamente activos con potencial de generar errores en la lectura de absorbancias en el método de cuantificación de la muestra. Finalmente, el amortiguador TRIS-HCl presentó un índice de solubilidad aceptable, pues se lograron homogeneizar ambas fases. Durante el almacenamiento en congelación a -20° C, ambas fases se separaron nuevamente, sin embargo, la homogeneización se consiguió una vez más al agitar la muestra con ayuda de un agitador tipo vórtex o por simple inversión. Por ello, se decidió resuspender la muestra en este último amortiguador.

Posterior a la resuspensión en TRIS, se hizo la extracción por el método diclorometano – metanol. Con ello, se obtuvieron las concentraciones de proteína de cada muestra, las cuales se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12

Estandarización del amortiguador para resuspensión de proteína. Se muestra el grado de solubilización, así como notas a considerar para la elección del amortiguador a usar.

Amortiguador	Composición	Volumen máximo	Grado de solubilización	Resultado
PBS	NaCl 1.37 M KCl 27 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM KH ₂ PO ₄ 18 mM	1.5 mL	Bajo	La proteína no se mezcló con el amortiguador. Se quedaron dos fases: líquida (PBS) y sólida (Botón de proteínas)
DIGE	Urea 7M Tiourea 2M TRIS 30 mM CHAPS 4%	1.5 mL	Alta	Se logró solubilizar el botón de proteínas, pero por los compuestos nitrogenados del amortiguador (como la Urea) se decidió no re suspender en éste para no afectar las reacciones colorimétricas de la curva de concentración de proteína.
TRIS-HCl	TRIS 50 mM HCl para nivelar pH	1.5 mL	Alta	Se logró re suspender a la proteína en el amortiguador, la solubilización fue completa. Durante el almacenaje se generaron dos fases, pero al agitarlas se homogeneizaba otra vez.

Tabla 13

Rendimiento de proteína. Concentración de proteína para 0.5 gramos de tejido cerebral disuelto en un volumen total de 1.5 mL de amortiguador TRIS.

Muestra	Concentración promedio $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Rendimiento μg
Control 1	2.73	546
Control 2	4.28	856
Control 3	6.66	1332
Control 4	6.41	1282
Caso 1	6.03	1206
Caso 2	8.52	1704
Caso 3	6.65	1330
Caso 4	7.47	1494
Caso 5	6.95	1390

8.2. Separación de proteínas por electroforesis monodimensional

La Fig. 10 muestra el gel obtenido de la electroforesis monodimensional, en el cuál, las proteínas se separaron en función de su peso molecular. Éstas se pueden visualizar como bandas en el gel debido a la tinción con Coomassie. El patrón de bandeo proteico de todas las muestras es similar en virtud de que la separación carece de alta especificidad, puesto que dichas bandas representan la confluencia de múltiples proteínas con pesos moleculares similares y no una identidad individual.

Esta separación inicial fue posible por la interacción de proteínas con el detergente SDS, puesto que rompió las uniones que forman las estructuras terciarias y cuaternarias, permitiendo así una disminución estructural. Además, las proteínas adquirieron una carga negativa, lo que propició su migración hacia el cátodo (hacia abajo) al usar la fuente de poder. No obstante, también hicieron contacto con el β -mercapto, otro agente desnaturizante que también propició una disminución en el tamaño de las proteínas nativas y, con ello, un aumento en la densidad de carga de estas subunidades formadas, favoreciendo así la migración.

Como se mencionó en páginas anteriores, estos geles sirven para verificar que la extracción de proteína y la cuantificación mediante el método de Lowry-Peterson se realizaron de manera correcta. La intensidad y tamaño en las diferentes bandas de las muestras denota que así fue, pues estas son similares. Por otra parte, se puede observar también que no hay degradación de la proteína, pues se ven bandas bien definidas y no se ven líneas barridas ni ruido de fondo excesivo. Se distinguen grupos de proteínas tanto de alto peso molecular (250 KDa) como de bajo peso molecular (10 KDa).

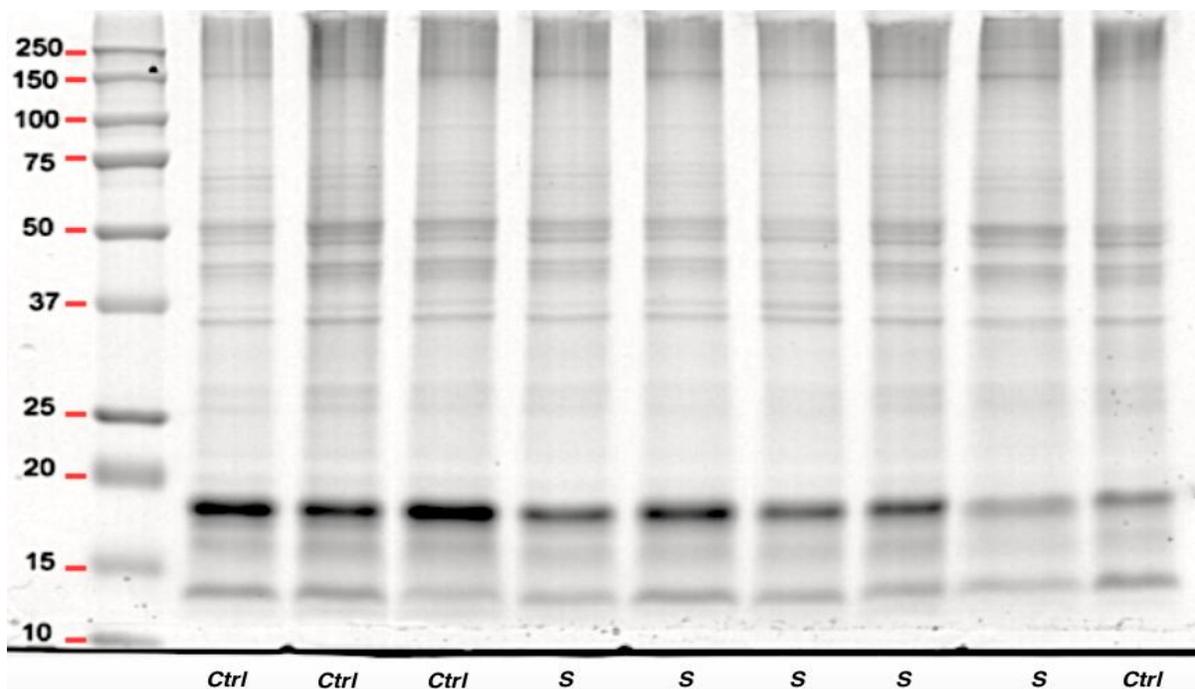


Figura 10. Gel de integridad. Se muestra la migración de las proteínas mediante una separación por peso molecular (SDS-PAGE). De izquierda a derecha: Peso molecular de las proteínas expresado en Kilo Daltones (KDa), bandas del marcador de peso molecular empleado (MPM), patrón de bandeo de las diferentes proteínas contenidas en las muestras de tejido cerebral. La nomenclatura correspondiente se encuentra en la parte superior y en la parte inferior se muestra los grupos S (suicidio) y Ctrl (Control). Se observan las bandas debido a la tinción con Coomassie.

Para realizar una mejor resolución en la separación de proteínas, se hicieron los geles bidimensionales

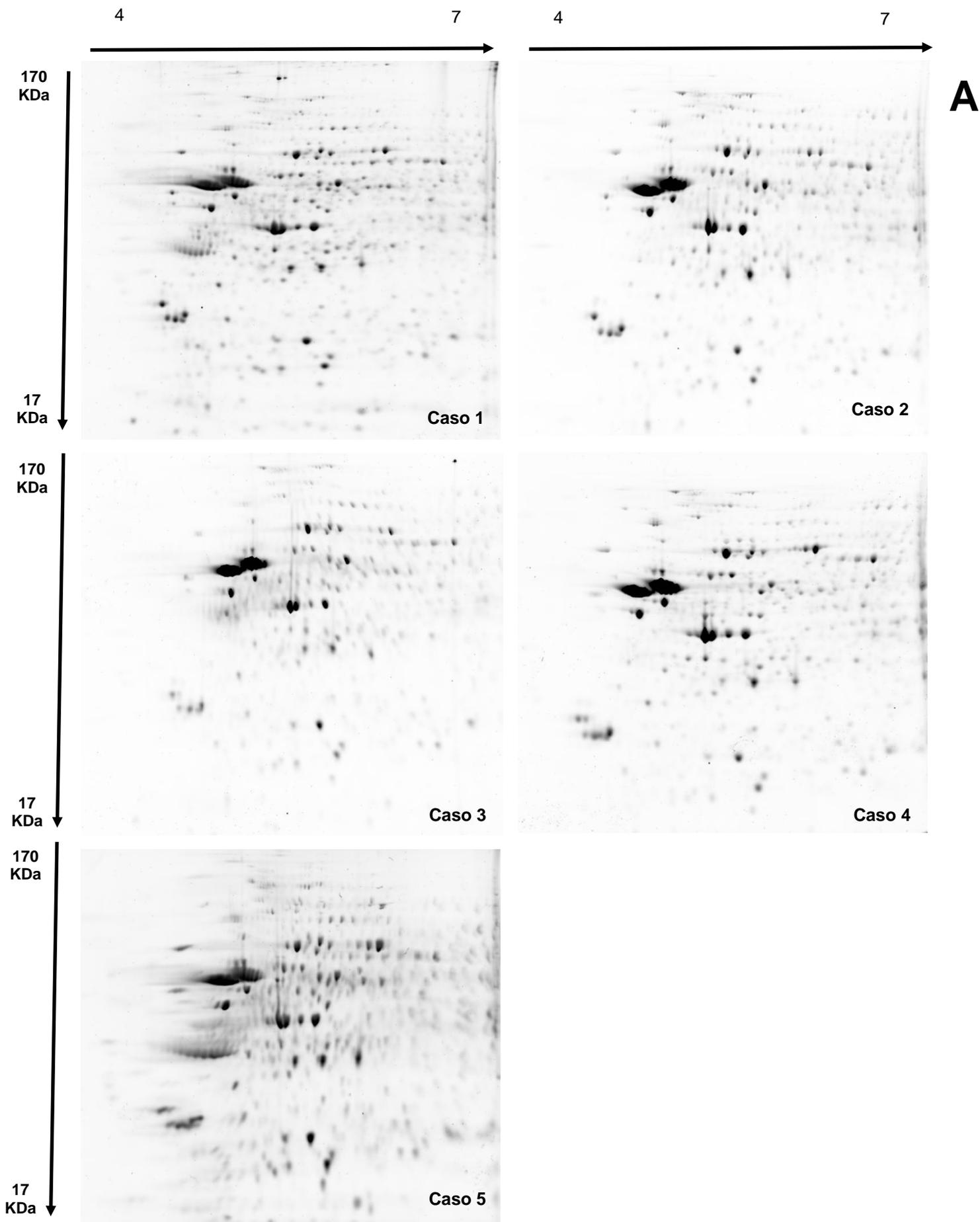
8.3. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional e identificación por EM

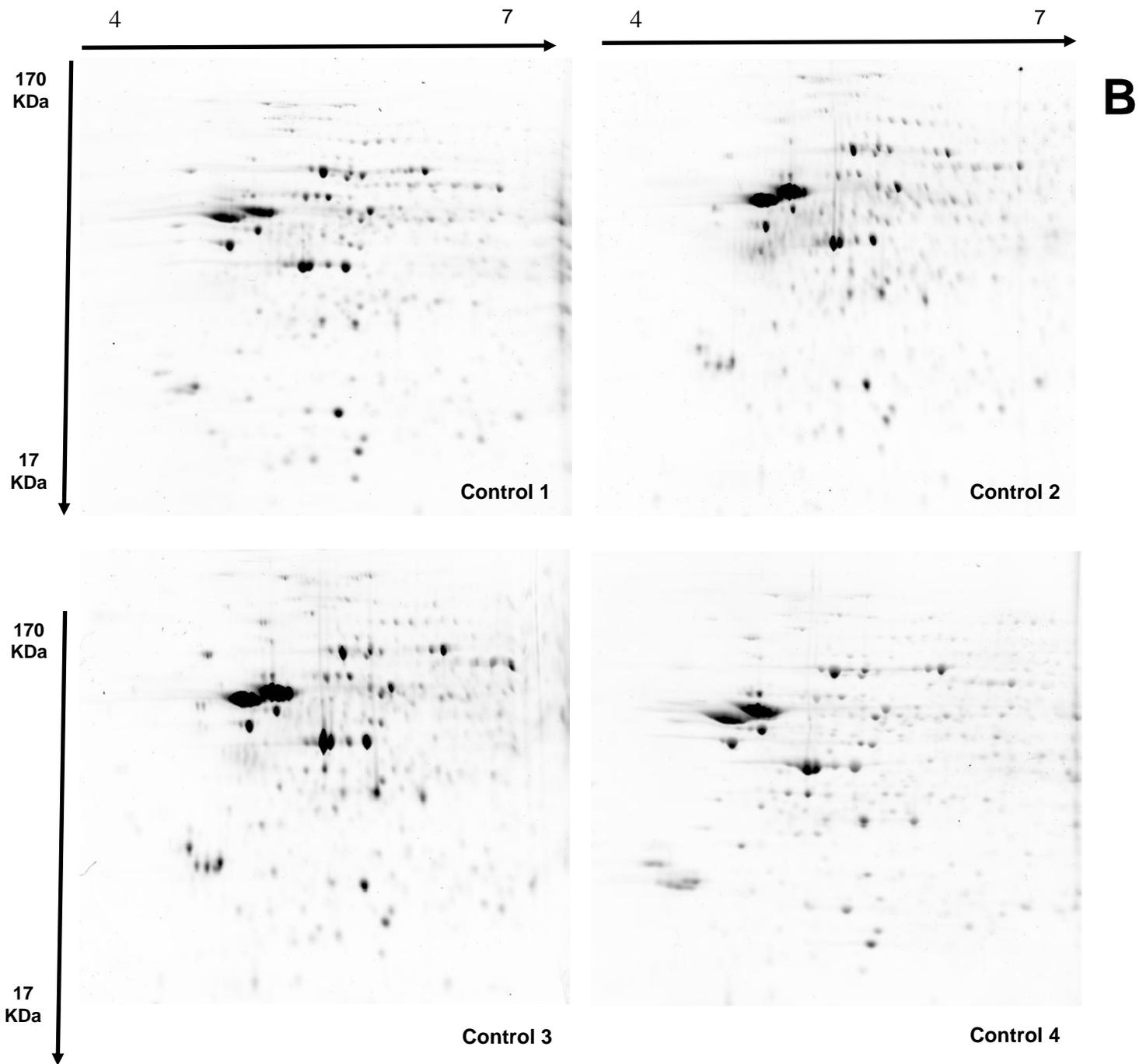
La separación por electroforesis bidimensional se puede observar en la Fig. 11, cuyos geles tienen diversos “spots” o manchas que representan a las proteínas. A pesar de que la separación en este experimento es más específica que en la electroforesis monodimensional, una mancha puede representar una o múltiples proteínas con punto isoeléctrico y peso molecular similares, así como isoformas.

Para estos casos, el eje de las “X” representa el gradiente de pH usado con las IPGs, el cuál va de 4 a 7. El peso molecular se puede observar en el eje de las “Y”, que va de los 17 a los 170 KDa.

Como se puede observar, la separación de proteínas en los geles bidimensionales muestra en su mayoría una buena resolución, pues se distinguen manchas bien definidas y distribuidas a lo largo y ancho de los geles, además de presentar un patrón similar entre los mismos. Las manchas se pudieron visualizar por la tinción con SyproRuby (observado a 630 nm de longitud de onda, rango UV), un colorante fluorescente que formó una unión con las proteínas a través de mecanismos de interacción electrostática con el nitrógeno y el oxígeno de residuos de aminoácidos como lisina, histidina y arginina.

La disgregación de proteínas en el gel constó de dos fases, de las cuáles la primera fue la del isoelectroenfoque, en donde las proteínas fueron separadas de acuerdo a su carga.





B

Figura 11. Geles bidimensionales obtenidos para cada muestra. La Fig. A representa los geles de muestras de individuos que murieron por suicidio, mientras que la Fig. B representa los geles de las muertes por causas ajenas al suicidio. Las flechas horizontales indican el pH al que se corrieron los geles para el isoelectroenfoque, mientras que las flechas verticales brindan información acerca del peso molecular mínimo y máximo en la separación de proteínas.

Lo anterior se logró por la diferencia del punto isoeléctrico entre las diversas proteínas, dicha propiedad está en función de la cadena de aminoácidos, pues la composición estas puede variar y con ello su naturaleza. Moléculas con abundantes aminoácidos como el ácido glutámico, tendrán puntos isoeléctricos más cercanos a un pH ácido que aquellas moléculas con aminoácidos básicos.

A pesar de ello, el punto isoeléctrico no sólo está en virtud de unos cuantos aminoácidos, sino de todos aquellos que conforman a la proteína. Estas biomoléculas pueden comportarse como ácidos o como bases debido a que presentan grupos ácidos (carboxilo) y básicos (amino), por lo que podrá presentar más de un pKa (constante de disociación ácida), es decir, más de un valor en el cual podrá donar el protón del carboxilo o recibirlo en el amino, ocasionando así una diferencia de cargas en la molécula. Por ello, el punto isoeléctrico de una proteína está dado por los pKa de su cadena de aminoácidos.

Las IPGs son tiras con gradientes de pH, en las cuáles se introduce la muestra de proteínas y comienzan a interactuar con el medio enriquecido con anfólitos, proviendo así un ambiente idóneo para que las proteínas lleguen a un pH estable en el que su carga neta es igual a cero, por lo que quedan inmobilizadas en ese punto y listas para ser separadas en la segunda dimensión.

Esta siguiente separación está dada por el peso molecular de las proteínas bajo la misma premisa que la electroforesis monodimensional. La razón por la cual hay una mejor resolución en la separación es la sinergia de ambos factores, pues el número de proteínas con mismo peso molecular y punto isoeléctrico es menor que para cada factor de manera individual.

Aún con todo lo anterior, se pueden alcanzar a observar diferencias en ciertas manchas o grupos de las mismas, esto al comparar la condición de los controles y de las muestras de suicidio. El total de manchas analizadas fue de 264, de los cuáles se seleccionaron únicamente doce. De este número, seis son proteínas expresadas a la alta y seis expresadas a la baja en los casos.

La Fig. 12 muestra un promedio de un gel único para cada condición, así como el señalamiento de aquellas proteínas diferencialmente expresadas.

Los geles maestros o master gel son el promedio de la expresión de las proteínas de cada una de las muestras. Como se señaló en la sección 8.10, la selección de las manchas o grupos tuvo diferentes puntos a considerar, sin embargo, pueden existir errores técnicos en las corridas de los geles, así como ruido de fondo, que pueden confundirse con proteínas. Por ello, el gel maestro ayuda a recopilar todos estos datos y únicamente marca aquellas manchas que están presentes en todos los geles de la misma condición, con el fin de disminuir el margen de error en el perfil obtenido al ser un gel virtual que homogeniza el perfil electroforético de las muestras de cada condición.

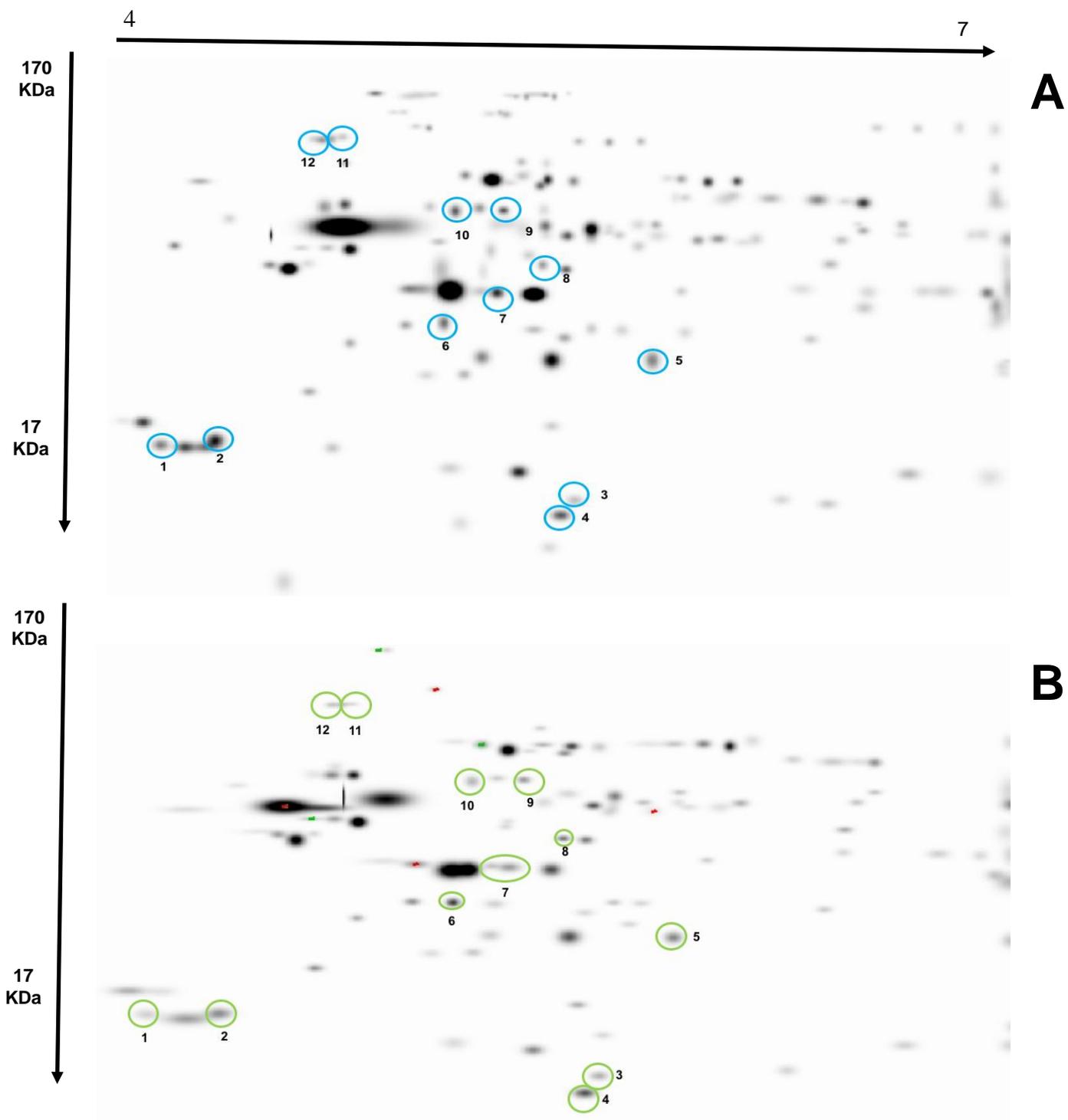


Figura 12. Geles maestros. A) Gel maestro de las muestras de suicidio. B) Gel maestro de las muestras control. En ambas, se señalan y enumeran las proteínas diferencialmente expresadas. Flechas horizontales: señalan el intervalo de pH que se usó para la separación por isoelectroenfoque. Flechas verticales: Valores máximo y mínimo de peso molecular expresados en Kilo Daltones.

8.4. Identificación de las proteínas candidatas

Así, se hizo la selección de las proteínas candidatas y por medio de la espectrometría de masas (realizada por el equipo de la Unidad de Proteómica del INMEGEN) se pudo identificarlas, como se observa en la Tabla 14.

Se puede observar que no todas estas proteínas alcanzaron un valor de cambio de ± 1.5 , sin embargo, la prueba T arrojó valores menores a 0.05 en todas ellas, por lo que se decidió investigar la relevancia de las mismas al estar expresadas a la alta o a la baja en los casos.

Tabla 14*Proteínas candidatas identificadas mediante espectrometría de masas acoplada a MALDI-TOF.*

No. De proteína en gel	Nombre de la proteína	Código de acceso en Uniprot	% de cobertura	Gen	Vía (s) biológica / molecular	Expresión en suicidio	Log2 Valor de cambio	Valor de p en prueba T
1	Proteína 14-3-3-Zeta/Delta	P63104	42	<i>YWHAZ</i>	Proteína de unión de cinasas, caderinas, ARN	A la baja	0.49	8.9 E ⁻⁵
2	Proteína 14-3-3 gamma	P61981	20.7	<i>YWHAG</i>	Regulación de plasticidad sináptica. Diferenciación neuronal.	A la alta	0.53	0.002
3	Glutación S- Transferasa P	P09211	41.4	<i>GSTP1</i>	Respuesta antioxidante ante xenobióticos y endobióticos. Combate estrés oxidante	A la baja	-0.36	0.007
4	Peroxiredoxina 2	P32119	38.9	<i>PRDX2</i>	Antioxidante en respuesta al H ₂ O ₂ . Combate estrés oxidante	A la baja	-0.49	0.002

5	L-Lactato deshidrogenasa cadena B	P07195	17.7	<i>LDHB</i>	Función metabólica. Síntesis de lactato a piruvato	A la baja	-0.95	0.0002
6	Proteína GNAO1	P09471	32.5	<i>GNAO1</i>	Proteína G. Receptor en señalización dopaminérgica	A la alta	1.03	0.009
7	Creatin cinasa tipo B	P12277	43.6	<i>CKB</i>	Desarrollo de sustancia negra y cerebelo.	A la baja	-1.01	0.005
8	Guanin deaminasa	Q9Y2T3	14.1	<i>GDA</i>	Desarrollo del sistema nervioso. Metabolismo y catabolismo de la guanina	A la alta	1.03	0.001
9	Alfa - internexina	Q16352	49.7	<i>INA</i>	Organización de los neurofilamentos. Desarrollo de sustancia negra	A la baja	-0.90	0.01
10	Proteína mitocondrial de choque térmico de 60 KDa	P10809	51.5	<i>HSDP1</i>	Plegamiento de proteínas. Regulación de procesos apoptóticos	A la alta	0.52	0.003

11	Proteína de choque térmico HSP-90 Beta	P08238	23.2	<i>HSP90A</i> <i>B1</i>	Extensión axonal. Regulación de apoptosis neuronal. Metabolismo de xenobióticos. Regulación de diferenciación y tamaño celular	A la alta	1.75	0.005
12	Proteína de choque térmico HSP-90 Alfa	Q8TBA7	21.2	<i>HSP90A</i> <i>A1</i>	Plegamiento de proteínas. Respuesta a estrés	A la alta	1.027	1.9 E ⁻⁶

Nota: También se observa el logaritmo en base 2 del valor de cambio obtenido en MetaboanalystR, así como el valor de p obtenido en la prueba T de Excel. El porcentaje de cobertura utilizado para la identificación se obtuvo mediante el software de búsqueda Paragon, de ProteinPilot con un porcentaje de confianza de 66%.

8.5. Análisis estadístico

Una vez identificadas las proteínas, se hizo el análisis estadístico. Se presenta el el gráfico de volcán (Fig. 13). Éste gráfico traza la relación obtenida entre el valor de cambio (fold change) y el valor de p de la prueba de T. Se resaltan las proteínas diferencialmente expresadas respecto al resto.

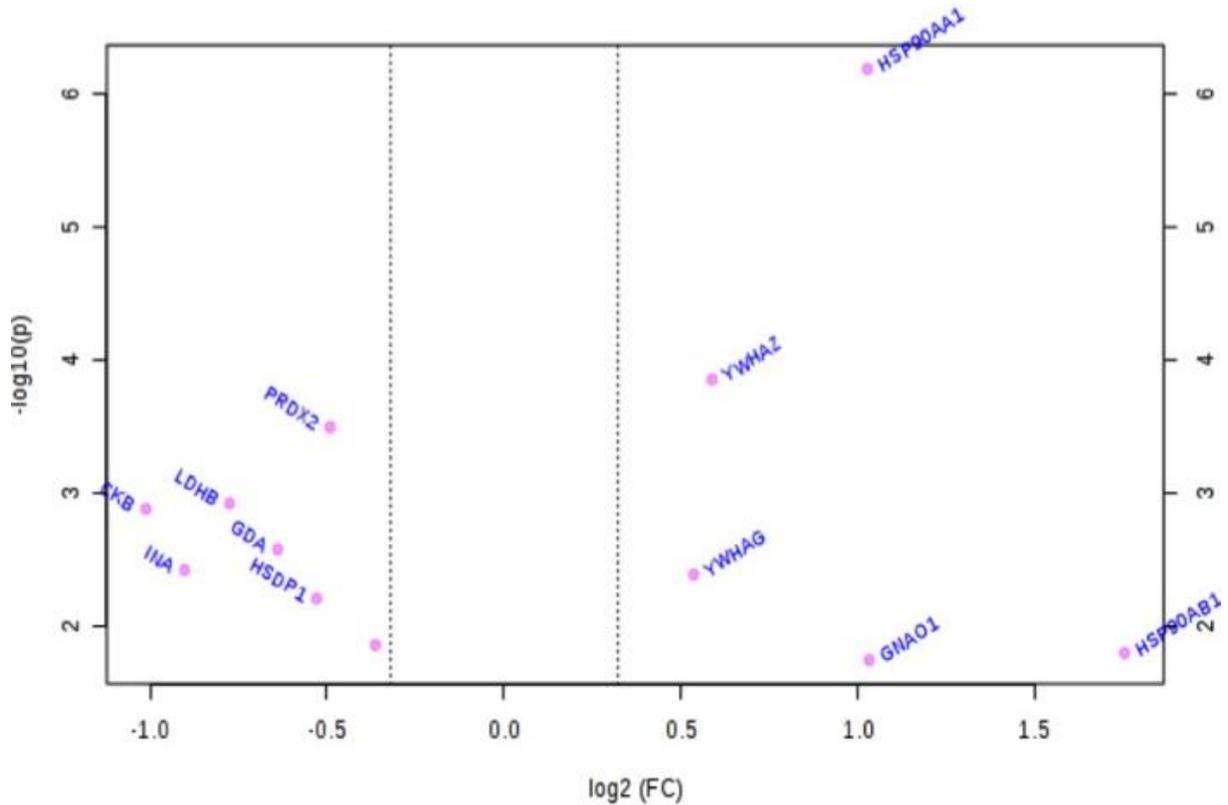


Figura 13. Diagrama de volcán. Se resaltan las proteínas diferencialmente expresadas, el eje de las “y” muestra el menos logaritmo en base 10 del valor de p, mientras que el eje de las “x” muestra el logaritmo en base 2 del valor de cambio o fold change (FC), obtenida mediante MetaboAnalystR.

Con el fin de ver qué tan diferentes son ambas condiciones, se realizó el análisis por componentes principales, con el que se obtuvo un “score plot” o diagrama de resultados. Éste método se basa en la reducción de la dimensión que describe la información de un conjunto de variables observadas, es decir, de los resultados de intensidad de las manchas obtenidos en los experimentos en segunda dimensión.

Al reducirlos, genera variables más pequeñas que reciben el nombre de componentes principales, que se caracterizan por ser variables no correlacionadas.

De manera general, el score plot que se muestra en la Fig. 14 es un tipo de diagrama de dispersión que representa los valores de los individuos en los componentes principales obtenidos, mostrando así la máxima variabilidad entre ambas condiciones para distinguir grupos o patrones que presentes similitudes.

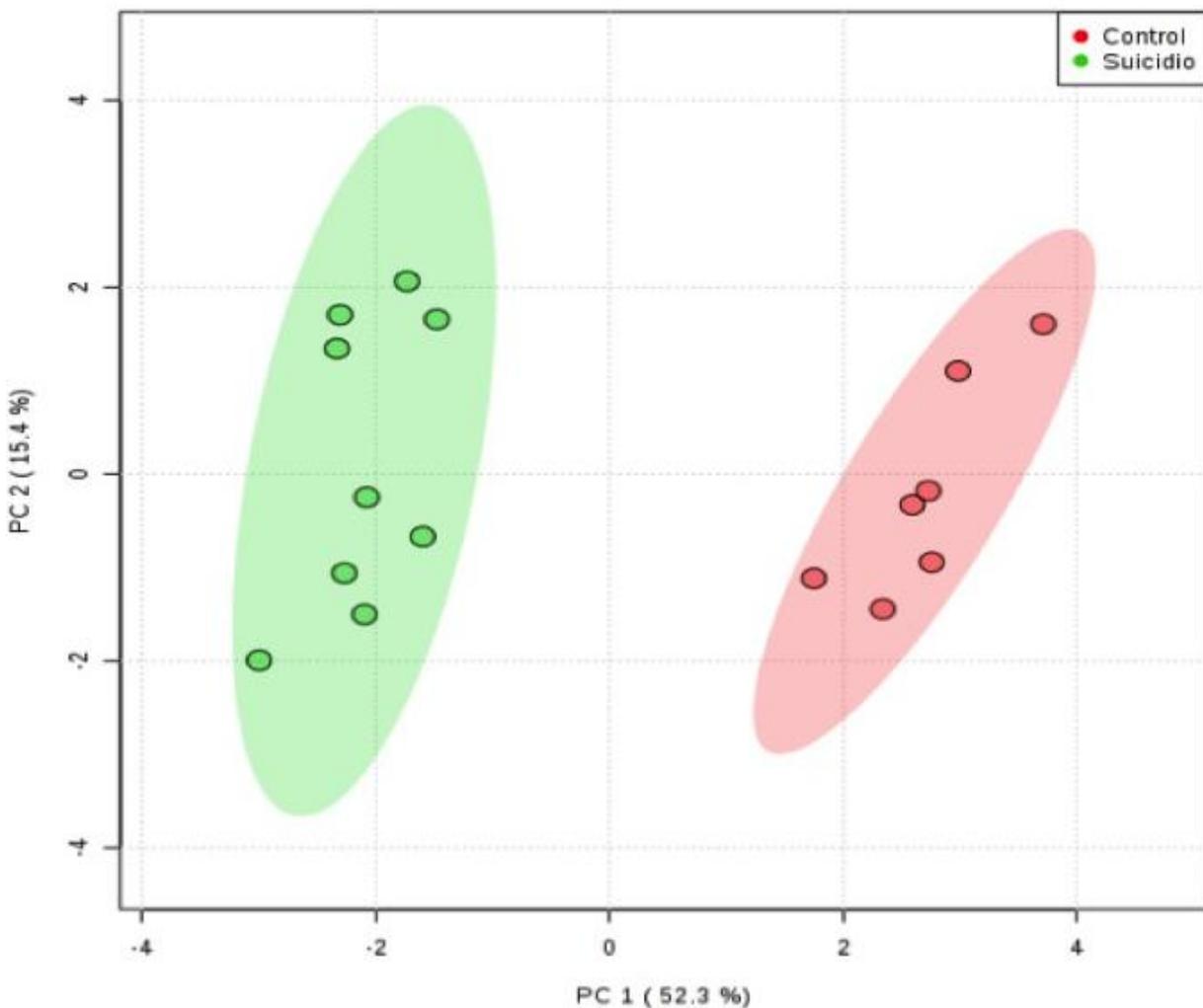


Figura 14. Diagrama de resultados (score plot). Se observan los grupos formados mediante el análisis de componentes principales. El eje horizontal muestra el componente principal 1 con un valor del 52.3%. Por otro lado, el eje vertical muestra el componente principal 2 con un valor del 15.4%. El grupo formado de color rojo representa al grupo control, mientras que el color verde indica la formación del grupo de suicidio, obtenido mediante MetaboanalystR.

Como se observa en la Fig. 14, el análisis por componentes principales reconoció dos grupos diferentes mediante dos componentes principales. El primero de ellos (PC1) muestra que el 52.3% de la varianza de los datos toma esa dirección al graficarse como una coordenada. Esto, por supuesto, utilizando también al componente principal 2 (PC2), cuyo valor corresponde a 15.4%, es decir, la otra dirección. La suma de ambos componentes da un resultado del 67.7%, lo que indica que ese porcentaje en esas direcciones es en donde se encuentra la mayor varianza de los datos para ambas condiciones. Por lo que, se puede decir, que estos datos no muestran similitudes entre la condición de suicidio y la condición control, indicando así que la expresión de las proteínas es diferente para las muestras de suicidio respecto a las muestras control.

Finalmente, se realizó un mapa de calor, en el que se puede ver proteína por proteína la expresión diferencial en ambas condiciones. Esto se aprecia en la Fig. 15.

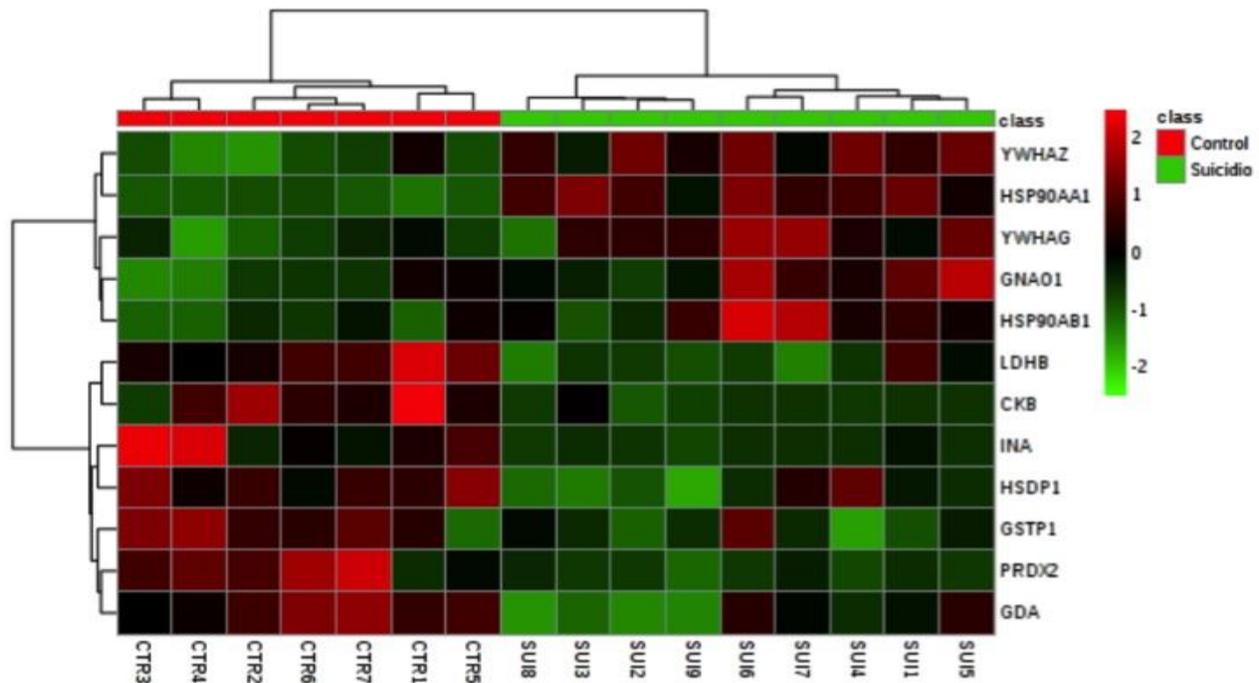


Figura 15. Mapa de calor de la expresión de proteínas en las diferentes muestras, Arriba a la derecha, se observan la clasificación de los grupos o clases, así como una barra de color que indica los valores de expresión para cada proteína, siendo los colores rojizos aquellos con valores de 1 a 2, el negro indica valores de 0 y los verdes representan valores entre -1 y -2.

8.6. Análisis de vías

Se realizó un análisis de las vías biológicas obtenidas mediante el software STRING. Las redes representan la conectividad que existe entre las proteínas, logrando visualizar a estas últimas como nodos. Los nodos presentan conexiones unos con otros, éstas se representan con las líneas de colores. El número de entradas a cada nodo se denomina grado.

La primer vía (Fig. 16), muestra las interacciones de todas las proteínas candidatas para ver la relación entre las mismas. Como se observa, la topología de la red muestra que 4 proteínas (GSTP1, GDA, INA, GNAO1) no se relacionan de ninguna manera con las demás del grupo, mientras que el resto están conectadas por diferentes tipos de interacciones. Se puede apreciar el grado de conectividad de cada nodo, siendo los más conectados LDHB, HSP90AA1 y HSP90AB1 (5 conexiones con otros nodos), seguido de PRDX2, HSPD1, YWHAZ y YWHAG (4 conexiones con otros nodos) y CKB con una única conexión con LDHB. Lo anterior sugiere que LDHB, HSP90AA1 y HSP90AB1 son los nodos centrales de esta red, es decir, aquellos por los que pasa la mayoría de la información y que posiblemente alguna alteración en ellos podría generar un cambio en la red.

Por otro lado, la máxima relación de interconexión se encuentra entre HSP90AA1 - HSP90AB1 (6 interacciones), seguido de YWHAZ - GNAO1 (5 interacciones) y PRDX2 – LDHB (4 interacciones), terminando con aquellas con 2 o 3 conexiones. De acuerdo a la información de STRING, esto simboliza una relación más estrecha entre estas proteínas, como co-expresión, o que sus genes son vecinos en el genoma o, más aún, que dos genes más sencillos se unen para generar estas proteínas. También puede ser representación de que se ha reportado co-expresión o interacciones de proteínas homólogas a estas en otras especies en diversos estudios.

Se obtuvieron además las dos vías biológicas mayormente enriquecidas por el software, es decir, aquellas en las que las proteínas candidatas pueden estar, al menos de forma parcial, conectadas biológicamente como grupo. La Fig. 17 muestra

la vía de desarrollo del sistema nervioso, que contiene 8 de las 12 proteínas candidatas que se visualizan de color morado. Por otro lado, también muestra la vía de respuesta a especies reactivas de oxígeno, con 4/12 proteínas implicadas que se resaltan en rojo. Ambas vías se obtuvieron con un FDR de 0.0153 respecto a un α de 0.05.

El FDR controla la proporción esperada de “descubrimientos” que son falsos, es decir, disminuye el número de hipótesis nulas rechazadas cuando se hacen comparaciones múltiples, disminuyendo de esta manera el número de falsos positivos, lo que significaría que hay un 0.0153% de probabilidad de que las vías biológicas a continuación mostradas correspondan a un falso positivo.

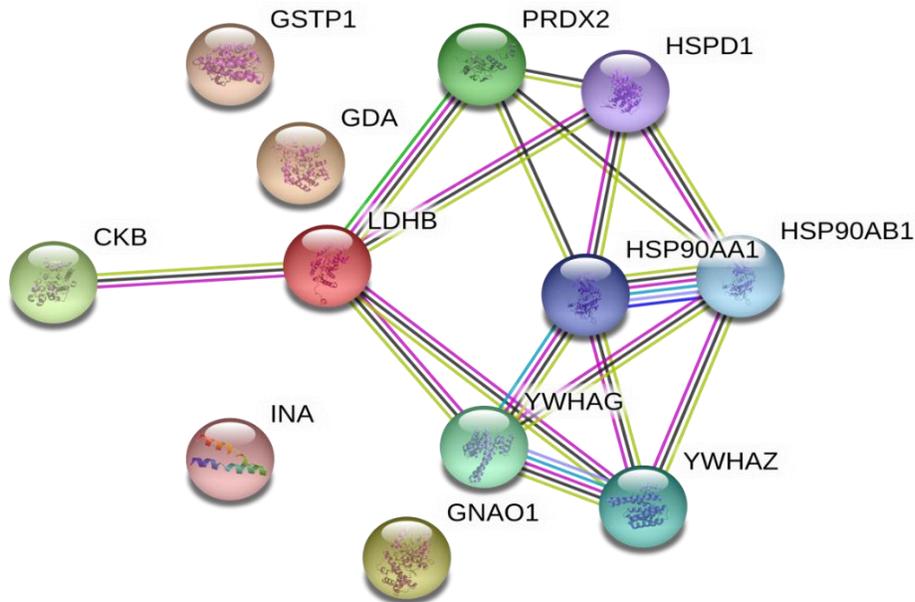


Figura 16. Red de interacción general de las proteínas candidatas. Las proteínas se representan como nodos y tienen su nombre en la parte superior. Las interacciones se denotan como líneas de colores entre los diferentes nodos. Obtenida mediante STRING.

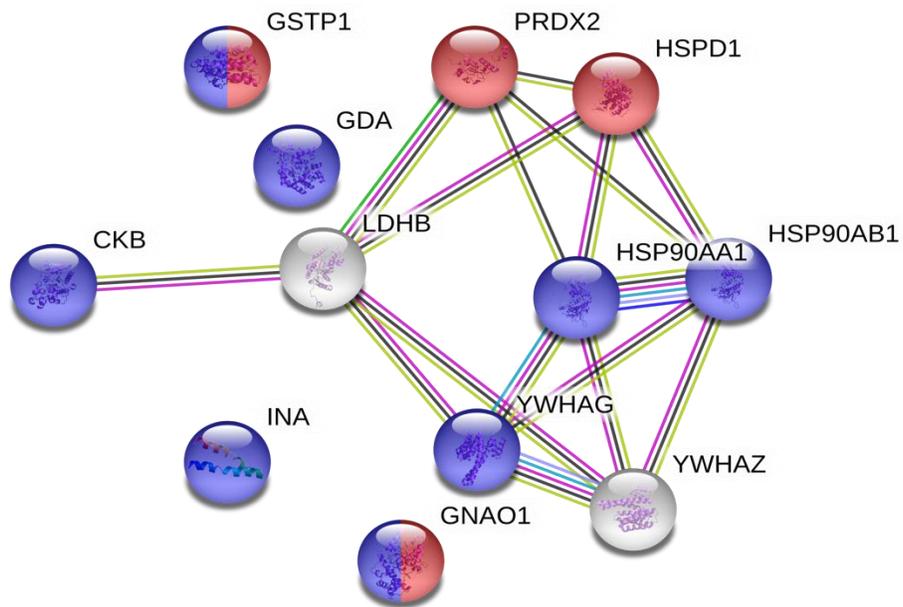


Figura 17. Vías biológicas en las que participan las proteínas candidatas. En morado, se resaltan las proteínas que participan en la vía del desarrollo del sistema nervioso. En rojo, se visualizan aquellas proteínas que participan en la vía de respuesta a radicales libres. Obtenida mediante STRING.

IX) Discusión

El suicidio es un fenómeno multifactorial que puede estar influenciado por diferentes factores de riesgo, desde los sociales hasta los moleculares.

En el presente estudio se trabajó con un enfoque molecular, con el que identificamos diferencias en la expresión de proteínas de la CPFDL, las cuáles podrían estar involucradas en el suicidio.

Debido a que el proteoma del suicidio no se ha esclarecido por completo, muchas de las referencias y estudios que se usan para comparar corresponden a trastornos mentales, pues comparten características y presentan un alto grado de comorbilidad con el suicidio.

Las proteínas candidatas que a continuación se describen, se abordarán desde el tipo de función que desarrollan en las células, así como su papel en las redes biológicas participando de manera conjunta.

A continuación, se describen las dos vías biológicas mayormente enriquecidas en las que las proteínas candidatas participan, así como aspectos de relevancia de cada una de ellas.

9.1. Vía de respuestas a radicales libres.

Estas proteínas juegan un rol importante en la homeostasis química del cerebro humano en la respuesta a radicales libres, es decir, cualquier especie química que tiene uno o más electrones desapareados. Se sabe que una mala regulación en el sistema de respuesta a radicales libres puede causar efectos adversos como estrés oxidante que, aunque puede afectar a cualquier parte del cuerpo, el cerebro se presenta como el órgano más susceptible por sus altos requerimientos energéticos y su incapacidad para almacenar oxígeno y/o aumentar los capilares (Kumar *et al.* 2012).

9.1.1. Glutación S- transferasa Pi (GSTP1)

De manera general, las glutación S – transferasas (GSTs) son una superfamilia de péptidos enzimáticos de la fase II, es decir, moléculas implicadas en la desintoxicación y mantenimiento de la homeostasis del organismo, que evitan principalmente el daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO se pueden formar por el metabolismo de xenobióticos (sustancias ajenas al cuerpo, como medicamentos) y de endobióticos. Como su nombre sugiere, esta molécula está involucrada en la biología del glutación (tiol de bajo peso molecular). Éste pequeño péptido está constituido de tres aminoácidos: ácido glutámico – glicina – cisteína (Tew, 2007. Kumar *et al*, 2016).

Su mecanismo de acción consiste en catalizar la conjugación de compuestos hidrofóbicos a electrofílicos con glutación reducido (GSH) a través del grupo sulfhidrilo de la cisteína. Con ello, se disminuye la formación de ERO a través de la creación de productos no tóxicos solubles en agua (Sun *et al*, 2011).

Las GSTs están presentes en células procariontes y eucariontes, pudiéndolas encontrar en citosol, microsomas y mitocondrias. Existen al menos 7 grandes clases que se diferencian por su secuencia de aminoácidos: Alfa (α), Mu (μ), Omega (Ω), Sigma (σ), Theta (θ), Zeta (ζ) y Pi (π), siendo esta última la GSTP1 (Gawryluk *et al*, 2011).

En humanos, la GSTP1 es codificada por el gen del mismo nombre en el cromosoma 11q13, estando constituida por aproximadamente 210 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25 KDa (Tew, 2007).

Diversas GSTs se expresan en tejido cerebral, sin embargo, las mayormente expresadas son de la clase α , μ , y π . Lo que resulta interesante en este caso, es que la isoenzima α únicamente se ve expresada en el cerebro adulto, pero la isoenzima π está presente desde el neurodesarrollo, siendo la más abundante en todo el tejido cerebral (Gawryluk *et al*, 2011). Su expresión se ha encontrado en células neuronales, en células gliales y en células endoteliales, a pesar de ello, a

nivel de corteza cerebral, sólo se ha reportado en células gliales (astrocitos), endoteliales y del neurópilo (The Human Protein Atlas, Kumar *et al*, 2016).

Si bien no hay muchos reportes de la GSTP1 en suicidio, se ha estudiado desde hace algunos años para diferentes desórdenes mentales (esquizofrenia y trastorno bipolar), trastornos del neurodesarrollo (trastorno del espectro autista – TEA) y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Kim *et al*, 2015. Gawryluk *et al*, 2011. Williams *et al*, 2007. Kumar *et al*, 2016, Gu *et al*, 2014).

Se ha reportado que una mala regulación en el sistema de desintoxicación por ERO puede generar estrés oxidante. La constante producción y limitada / nula degradación de las ERO en el tejido cerebral puede ocasionar daños a diversos niveles, causando afecciones en proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, hasta lograr daños a nivel celular y tisular (Filomeni y Ciriolo, 2006).

El GSH es el antioxidante endógeno más importante del cuerpo, pues regula tanto la desintoxicación por metabolitos liberados por el consumo de xenobióticos, como la dinámica oxidante natural causada por los diferentes procesos celulares. Además, juega un papel importante en procesos fisiológicos relevantes como la señalización apoptótica, diferenciación y proliferación celular (Gu *et al*, 2014).

Por otra parte, existe la paradoja del oxígeno, en la que se describe la importancia del oxígeno para la vida de los seres aerobios, pero también su alta toxicidad por radicales debido a fallas en su metabolismo (Davies, 1995). Se sabe que el cerebro, al ser el órgano que consume más energía, libera una constante cantidad de ERO por la cadena de transporte de electrones que tiene lugar en la mitocondria (Stepanova *et al*, 2018).

Ésta proteína se encontró menos expresada en las muestras provenientes de individuos que murieron por suicidio, lo que sugiere una falla en el sistema de desintoxicación y un posible daño del tejido cerebral. Lo anterior debido a la importancia que juega el GSH en la dinámica desintoxicante del organismo en general, sin embargo, ésta reacción debe ser catalizada por una GST. La baja en la

expresión de la GSTP1 resulta interesante, pues es la isoenzima mayormente expresada en el tejido cerebral, lo que la convierte en una pieza clave en el mantenimiento de la homeostasis de este complejo órgano. Por ello, aunque los niveles de GSH en el tejido cerebral sean normales, la homeostasis no puede llevarse a cabo por la baja en la expresión de la proteína que se encarga de convertir las ERO en especies no tóxicas usando al glutati6n como sustrato.

No obstante, es de notable importancia que esto est1 sucediendo en la CPFDL, una de las zonas que conforman el circuito cerebral del suicidio hasta hoy descrito y en donde la GSTP1 se encuentra mayormente expresada. Por otro lado, el GSH tiene funciones de se1alizacion y procesos celulares de alta relevancia como los ya mencionados, por lo que este aspecto biol6gico tambi6n podr1a estar siendo afectado por la din1mica entre GSTP1-GSH.

Otro aspecto que resulta interesante es la expresi6n celular de esta prote1na, ya que no se encuentra en neuronas, pero s1 en astrocitos. La densidad neuronal es diminuta si se compara con la densidad astrogliol, pues 6sta 6ltima la supera en un orden de 10 veces, ocupando as1 la astrogli1a m1s del 25% del volumen cerebral (Hashimoto *et al*, 2005). Diversos estudios han identificado que los astrocitos participan activamente en las reacciones relacionadas con las ERO, y no s6lo eso, sino que son la principal fuente celular en el cerebro que realiza las funciones desintoxicantes, notando as1 que esta funci6n no s6lo se queda en ese tipo celular, sino que tambi6n pasa a las c6lulas vecinas: las neuronas (Dringen *et al*, 2015).

Lo anterior da pauta a pensar que la baja expresi6n de la GSTP1 est1 ligada a una falla astroc1tica, que est1 afectando tambi6n a las neuronas, pues la astrogli1a es la fuente celular principal de desintoxicaci6n cerebral por ERO.

9.1.2. Prote1na G(o), subunidad alfa 1 (GNAO1)

Las prote1nas G son segundos mensajeros en la comunicaci6n celular que participan en diversos procesos de transducci6n de se1ales para mediar distintos mecanismos moleculares. Se conocen 17 miembros de la familia de las prote1nas G, los cu1les se pueden categorizar en los siguientes subgrupos: prote1nas G

inhibitorias (Gi), proteínas G estimulantes (Gs), las proteínas G_{q/11}, proteínas G_{12/13} y “otras” proteínas G (Go) (Sreekumar *et al.* 2004). En las proteínas G, se encuentran las subunidades α , β , y γ , en donde el rol de α es adherirse a nucleótidos de guanina (como guanin trifosfato-GTP o guanin difosfato-GDP) para generar una respuesta (Mercé-Grau *et al.* 2016).

Las Go son un subtipo de Gi, pero su alta expresión (de 5 a 10 veces más que otra Gi) no sólo en el cerebro, sino en todo el sistema nervioso, les otorga esta pequeña subclasificación. Las Go componen del 0.5 al 1% de todas las proteínas membranales en el cerebro de mamíferos (Jiang y Bajpayee, 2009).

La expresión de la GNAO1 se ha reportado en otros estudios como una proteína candidata asociada a trastornos mentales como esquizofrenia (Jiang y Bajpayee, 2009, Chan *et al.* 2010) y depresión (Mallei *et al.* 2015) al expresarse más respecto a controles. No obstante, Jiang y Bajpayee (2009) reportan a las Go como moduladoras de la actividad de los canales de calcio (Ca²⁺) en las neuronas, en los que actúan como inhibidores y detienen el potencial de acción. Se ha reportado a esta proteína como mediadora de vías de neurotransmisión como la serotoninérgica, dopaminérgica, GABAérgica, glutamatérgica, colinérgica y las mediadas por opioides y cannabinoides (Bozorgmehr *et al.* 2017).

La GNAO1 se encontró expresada a la alta en los casos, resultado concordante con los estudios mencionados en el párrafo anterior. A pesar de que se sabe que actúa en el sistema de respuesta a radicales libres, no se encontraron estudios del mecanismo molecular específico de esta proteína para esta vía en particular, sin embargo, se puede hipotetizar que actúa en respuesta a drogas, sustancias tóxicas, anticuerpos, ERO y/o sustancias inorgánicas (de acuerdo a Quick Go del European Bioinformatics Institute).

Debido a que este tipo de proteínas está altamente expresada en membrana celular, se da pauta a pensar que participa de manera muy activa en procesos de señalización y comunicación con el medio extracelular, ya que puede participar

como receptor para un mensajero, por lo que su alta expresión podría estar modificando cuantitativamente la comunicación de la célula con el exterior.

Se plantea que la alta expresión de esta proteína podría estar afectando la comunicación neuronal en individuos que consumaron el suicidio, pues su potencial inhibitorio en dicha comunicación mediada por canales de Ca^{2+} podría reflejarse en una neurotransmisión diferencial debido a su acoplamiento como receptor de los neurotransmisores descritos anteriormente. De la misma manera, se resalta el hecho de que es la Go más abundante en el cerebro y su alta expresión podría estar influenciando no sólo la neurotransmisión, sino otros procesos fisiológicos en los que participa la GNAO1.

9.1.3. Peroxiredoxina 2 (PRDX2)

Ésta proteína citosólica también está involucrada en vías metabólicas de desintoxicación, pues es un antioxidante de procesos celulares endógenos relacionados con la regulación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se encuentra expresada en cerebro en células neuronales, más no así en células gliales (Serafian *et al.* 1999, Thul *et al.* 2017).

Al igual que la GSTP1, la PRDX2 es una proteína que se ha relacionado con diferentes trastornos psiquiátricos, tales como trastorno bipolar (Kazuno *et al.* 2013) y esquizofrenia (Davalieva *et al.* 2016).

El H_2O_2 no es una especie reactiva de oxígeno, sin embargo, tiene una capacidad lipofílica que le permite el paso a través de las membranas celulares y propicia su interacción con diversos metales reducidos, que pueden generar como subproducto de reacción radicales hidroxilo. No obstante, hoy en día se sabe que las peroxiredoxinas son las enzimas que se encargan del 90% de la desintoxicación por la formación de estos radicales en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (Zeida, 2015).

Cuando no hay un balance entre el sistema antioxidante mediado por peroxidasas y el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo (OH), al ser una especie química altamente

reactiva, puede interactuar con biomoléculas causando reacción con los grupos SH de las proteínas, lo que afectaría el centro de reacción de las enzimas y con ello su inactivación por modificaciones redox (es un tipo de MPT). A nivel de lípidos, puede generar peroxidaciones, a nivel de ADN, produce la hidroxilación de compuestos aromáticos de las bases nitrogenadas, ocasionando así una ruptura o modificaciones en las mismas (Iglesias, 2010).

Sin embargo, contrario a lo que se pensaba antes, el H₂O₂ no sólo tiene un papel negativo en los sistemas biológicos, sino que participa activamente en la señalización de procesos altamente relevantes como lo son la diferenciación, proliferación y migración celular, notando así que tanto el peróxido de hidrógeno, como los radicales OH que se liberan en su metabolismo, tienen un papel relevante en la función celular normal y en la progresión patológica (Rhee, 2006).

En este caso, la PRDX2 presenta una expresión a la baja en individuos que consumaron el suicidio respecto a controles, resultado similar a los obtenidos en la revisión de proteómica de la esquizofrenia realizado por English *et al*, 2011; también en la CPFDL, lo cual indica una posible relación con estos trastornos mentales.

Anteriormente se mencionó que la GSTP1 es una de las enzimas principales en la regulación metabólica oxidante, sin embargo, las peroxiredoxinas tienen un papel primordial cuando se habla del H₂O₂. Esto se recalca porque resulta llamativo el hecho de que la GSTP1 no se expresa en neuronas pero sí en glía y, por el contrario, la PRDX2 sí está en neuronas, más no así en glía de la misma región cerebral (CPFDL), lo que sugiere una falla en la respuesta a radicales libres de ambas células, cuyas proteínas principales en el sistema de desintoxicación celular se encontraron menos expresadas.

La inflamación es una respuesta ante diversas enfermedades y está involucrada en el desarrollo de las mismas, muchas de estas enfermedades están relacionadas con un aumento en la producción de ERO, que desencadena en un estrés oxidante que puede causar la oxidación de diversas proteínas. Se ha visto que la PRDX2 se libera ante condiciones de inflamación (Salzano *et al*. 2014).

Con lo anterior, es probable que el cerebro, uno de los órganos que producen más ERO por su alta capacidad / necesidad bioenergética, se ve obligado a tener un buen sistema de desintoxicación para mantener un buen funcionamiento, por lo que irregularidades en la expresión de estos protagonistas moleculares puede resultar en un grave estrés oxidante y daño cerebral a nivel de estructura, función y comunicación.

Particularmente, se propone que la baja expresión de la PRDX2 estaría conduciendo no sólo a una mala desintoxicación en la CPFDL, sino que también habría repercusiones en cuanto a los procesos de comunicación y señalización mediados por el OH, producto del metabolismo del H₂O₂.

9.1.4. Proteína de choque térmico de 60 KDa (HSDP1)

Las proteínas de choque térmico o “Heat shock proteins”, por sus siglas en inglés, son una familia de proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución. De forma general, se encargan del mantenimiento estructural de otras proteínas, previniendo de esta manera el plegamiento incorrecto y los agregados proteicos (Feder y Hofmann, 1999).

Durante mucho tiempo se creyó que eran simples chaperonas, sin embargo, en la actualidad se sabe que juegan un papel importante en procesos biológicos como la transducción de señales, la inhibición apoptótica, la autofagia, la regulación del sistema inmune y el desarrollo (Görtz *et al.* 2017).

Como su nombre sugiere, son proteínas que reaccionan ante estímulos de temperatura, incluyendo el estrés por calor. De esta manera, se ha visto que la expresión de estas proteínas aumenta cuando la célula pasa no sólo por estrés térmico, sino también por estrés por hipoxia, inflamación y estrés oxidante. La alta expresión de estas proteínas se ha relacionado con enfermedades como Alzheimer y Parkinson, entre otras neuropatologías, viéndose involucradas en la inflamación y degeneración del sistema nervioso central (Görtz *et al.* 2017).

Se encontraron tres proteínas de choque térmico expresadas a la alta en las muestras provenientes de individuos suicidas, entre las que destaca la HSDP1, que se ha sugerido como una proteína involucrada en diversas enfermedades que conllevan procesos inflamatorios.

Anteriormente se detallaron las proteínas PRDX2 y GSTP1, las cuáles se encontraron expresadas a la baja, planteando posibles irregularidades a nivel de señalización y estrés oxidante, la expresión diferencial de estas proteínas podría estar dando como resultado procesos inflamatorios en la corteza prefrontal dorsolateral y tejido adyacente, postulando así a la HSDP1 como proteína candidata al suicidio por su alta expresión.

De esta manera, se postula que las cuatro proteínas ya descritas comparten una relación biológica conjunta, por lo que la mayor o menor expresión de una, puede influir en la expresión de otra, por ejemplo, la baja expresión de la GSTP1 conlleva deficiencias en el sistema de desintoxicación cerebral, lo cuál genera estrés e inflamación, ambos factores que contribuyen al aumento de la expresión de proteínas como la HSDP1.

Otra de las relaciones que se postulan es la de la GNAO1, cuyo acoplamiento con múltiples neurotransmisores y su alta expresión en los casos puede estar, de alguna manera, cambiando la dinámica en la neurotransmisión respecto a cuando hay una menor expresión y, con ello, estar proviendo de estímulos causantes que repercutan tanto en la vía de desintoxicación, como en la de comunicación y señalización celular.

Todas las proteínas anteriormente descritas responden ante los radicales libres, que muchas veces son generados por la misma mitocondria para mantener los procesos energéticos en el cerebro y que sin una buena regulación generan estrés oxidante y, con ello, procesos inflamatorios. Por lo anterior, una de las grandes fallas que puede estar sucediendo en la CPFDL de individuos que consumaron el suicidio corresponde a la bioenergética de la célula y sus sistemas de desintoxicación.

9.2. Vía del neurodesarrollo

Las siguientes proteínas se encuentran involucradas en el neurodesarrollo a diferentes niveles de organización biológica y mediada por diferentes procesos celulares. Por lo anterior, se hicieron subgrupos con fines de redacción.

9.2.1. Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*): HSP90AA1 y HSP90AB1

Anteriormente se mencionó la relevancia de las proteínas de choque térmico (HSP), a continuación, se describen otras dos proteínas pertenecientes a esta familia que presentaron expresión diferencial entre casos y controles.

Además del estrés biológico, las HSP, especialmente las HSP90, se han visto involucradas en trastornos mentales como esquizofrenia y desórdenes psicóticos por su papel como chaperonas presentadoras del antígeno de glucocorticoides en respuesta al llamado estrés conductual (Lin *et al.* 2014).

La función principal de las HSP90 es evitar los agregados de proteínas cuyo plegamiento es incorrecto y tienen un papel crucial en la señalización celular y como participantes en el plegamiento de receptores hormonales esteroideos, cinasas y otros componentes de señalización (Tóth *et al.* 2015).

Adicionalmente, se sabe que la acumulación de proteínas mal plegadas ocasiona estrés del retículo endoplásmico (localización subcelular en la que sucede la síntesis y el plegamiento de proteínas), lo que puede generar el fenómeno conchoido como respuesta a proteínas mal plegadas. Este complejo proceso celular tiene, entre sus repercusiones, cambios en la expresión de genes (Dombroski *et al.*, 2010). Se sabe que cuando hay fallas en la restauración o edición de las proteínas mal plegadas, se presentan diferentes tipos de enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, inflamatorias, entre otras (Kadowaki y Nishito, 2013).

Así, el supuesto aumento de proteínas mal plegadas por los eventos de respuesta deficiente a radicales libres no tiene sólo como consecuencia inmediata el aumento en la expresión de las HSP, sino que también podría influir en la dinámica que existe entre las posible proteínas mal plegadas y la función molecular en la que participan. No obstante, también habría repercusiones a nivel de comunicación endócrina, pues como se mencionó antes, presentan relevancia al ser chaperonas en el plegamiento de receptores hormonales.

La **HSP90AA1** y **HSP90AB1** se encontraron mayormente expresadas en la CPDLF de los casos, lo que sugiere que durante el estrés causado por las proteínas de la vía de respuesta a radicales libres se aumenta la cantidad de proteínas mal plegadas y, con ello, se da el aumento en la expresión de las proteínas encargadas de combatir este fenómeno: las HSP. Sin embargo, la posible modificación en la expresión de genes causada por la respuesta a proteínas mal plegadas tendría repercusiones en otras proteínas y en las vías en las que participan, pues la historia de estas biomoléculas no comienza a partir de su edición, sino de su origen genético, pasando por la parte transcripcional y las modificaciones que puedan presentar *a posteriori* a su síntesis.

De esta manera, tanto las HSP90AA1/AB1 y la HSDP1 podrían estar respondiendo no sólo ante estrés biológico (estrés oxidante, calor, etc.) sino también al estrés del retículo causado por el déficit en la respuesta a radicales libres, pues el aumento en la expresión de estas proteínas se da principalmente ante eventos estresantes.

9.2.2. Proteínas relacionadas a la bioenergética: CKB y LDHB

La creatina cinasa B (**CKB**) es una proteína que participa en la bioenergética del SNC a través del ciclo de la creatina fosforilada (CKBP), pudiendo convertir ADP a ATP mediante la CKBP en sitios en dónde se necesita la energía o usando ATP para generar CKBP como medio de almacenaje energético (Burbaeva *et al.* 2003).

Recordando, el cerebro presenta pocos sistemas de almacenaje de energía, pero aun así utiliza el 20% de la energía total producida en el cuerpo. Gran parte de ella es destinada a los gradientes iónicos transmembranales y a la neurocomunicación.

Para resolver esta problemática, el cerebro depende mucho de su sistema vascular, ya que los sustratos energéticos que viajan por el torrente sanguíneo son sustituidos constantemente mediante su circulación (Joncquel-Chevalier *et al.* 2015).

La CKB se puede obtener tanto de manera exógena, como de manera endógena. Ésta última resulta interesante porque las células del SNC presentan las proteínas y maquinaria necesaria para generar la CKB y su forma fosforilada, así como transportadores para su movilidad a través de las misma (Joncquel-Chevalier *et al.* 2015).

Burbaeva y colaboradores (2003) observaron una baja expresión de la CKB y, en general, irregularidades en el ciclo CKB/CKBP en muestras *postmortem* de individuos diagnosticados con esquizofrenia, hipotetizando que pudiera ser también una consecuencia ante un estrés oxidante, puesto que son altamente susceptibles al mismo.

Por otro lado, la lactato deshidrogenasa cadena B (**LDHB**) es la enzima que se encarga de la catálisis de piruvato a lactato. A manera de mecanismo general, la sangre lleva la glucosa al sistema nervioso, la cual es tomada por astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, para que en los dos primeros se metabolice a lactato. Esta última molécula puede servir como señalizadora de la plasticidad neuronal o puede usarse para la producción de ATP mediante su oxidación en el ciclo de Krebs (Bonvento *et al.* 2017).

La LDHB es codificada por genes específicos de astrocitos, participando estos en la regulación energética del cerebro y proveyendo a las neuronas de energía sobre todo cuando el sistema se encuentra bajo condiciones de estrés. No obstante, este mantenimiento energético se presenta como una suma de las vías de ambos tipos celulares (Zhang *et al.* 2014).

La baja en la expresión de una enzima tan importante como la LDHB podría generar una falla energética en la neurocomunicación mediada por neuronas y células

gliales, ocasionando incluso la muerte de las mismas por el déficit energético ante condiciones estresantes (Bonvento *et al.* 2017).

Este trabajo propone a la CKB y a la LDHB como proteínas candidatas del fenómeno en cuestión. Como ya se mencionó, la CKB es una de las principales proteínas en el mantenimiento energético de las células del sistema nervioso central, por lo que su baja expresión en la CPFDL de individuos que consumaron el suicido puede estar reflejando fallas en la energética cerebral. Esta falla se ve no solo a nivel de la CKB, sino del ciclo completo en la fosforilación y desfosforilación de la misma para obtener y/o almacenar energía.

En cuanto a la LDHB, cuya expresión también fue menor en las muestras caso, se sugiere también una falla en la bioenergética cerebral, pues es la enzima que brinda el sustrato necesario para la posterior obtención de ATP proveniente de las moléculas de glucosa de la sangre circundante.

De esta manera, se ve un fallo a nivel de la producción y almacenamiento de energía en el cerebro, lo cual puede estar ocasionando fallas o irregularidades a diferentes niveles. La falta de energía en un órgano tan importante puede generar daño a nivel de neuronas y de las diferentes células gliales y, con ello, direccionar un funcionamiento diferente en la CPFDL *per sé*, comprometiendo así los procesos y funciones complejas que se le han relacionado. No obstante, también se sugieren fallas a nivel de neurocomunicación por fallas energéticas en el transporte de neurotransmisores. Se visualiza nuevamente una disfunción a nivel de respuesta ante estrés, en este caso, estrés oxidante, pues como se mencionó anteriormente, el estrés puede ocasionar que la producción energética tanto de células neuronales, como gliales, disminuya debido a este fenómeno.

9.2.3. Proteínas relacionadas al citoesqueleto: YWHAG, YWHAZ, INA y GDA

La familia de las proteínas 14-3-3 se encuentra altamente conservada en todas las células eucariontes como proteínas de unión, en las que cada isoforma realiza esta función con mecanismos únicos y uniéndose a diferentes moléculas. Se les he

relacionado con múltiples fenómenos biológicos como el control del ciclo celular, funciones metabólicas y apoptóticas, así como en la patología del cáncer. No obstante, son altamente abundantes en el cerebro, conformando el 1% del total de sus proteínas (Bridges y Moorhead, 2005, Wachi *et al.* 2017).

Se sabe que participan en el desarrollo del SNC mediante la migración neuronal en corteza cerebral e hipocampo. Con múltiples experimentos, se ha visto mediante el silenciamiento de genes que la corteza cerebral tiende a adelgazarse y hay desorganización estructural del hipocampo. En particular, el silenciamiento de la 14-3-3 zeta (**YWHAZ**) se ha ligado a defectos en la migración neuronal en hipocampo y con alteraciones del comportamiento relacionadas con esquizofrenia (Wachi *et al.* 2015).

También se ha descrito que esta proteína participa en la producción de dopamina a través de la unión con la tirosina hidroxilasa y que participa en la unión de microtúbulos a través de la fosforilación de la proteína tau. No obstante, también se une a la δ -catenina, una de las proteínas del complejo de unión en el cerebro que es de alta importancia en el mantenimiento de la estructura neural y está implicada en la regulación de las funciones cognitivas. Su baja expresión en la CPFDL se ha relacionado con trastorno bipolar y esquizofrenia (Foote y Zhou, 2012).

Por otro lado, se ha visto que la 14-3-3gamma (**YWHAJ**) está involucrada en el transporte de proteínas y en procesos apoptóticos, así como en patologías en las que hay irregularidades en la migración neuronal. Se ha reportado que el aumento en la expresión de esta proteína retrasa la migración neuronal de la corteza durante el neurodesarrollo, sin embargo, este mismo efecto se ve cuando tiene una baja expresión, por lo que, ya sea a la alta o a la baja, el desequilibrio en la expresión de esta proteína puede dar pie a estas irregularidades (Cornell *et al.* 2016).

La alfa internexina (**INA**) forma parte de las proteínas que constituyen los neurofilamentos, es decir, los filamentos intermedios tipo IV de las neuronas maduras. Junto a los otros tres componentes (neurofilamentos de cadena media –

NFM, pesada – NFH y ligera – NFL) son las proteínas más abundantes del cerebro, cuyas alteraciones se han relacionado a trastornos mentales, pues están involucradas en el transporte axonal (Yuan *et al.* 2015).

Es una proteína involucrada en el neurodesarrollo y forma parte del complejo de neurofilamentos para el crecimiento axonal. Se ha reportado que el silenciamiento del gen que codifica la INA produce acumulaciones anormales de neurofilamentos (Cairns *et al.* 2004).

La YWHAZ fue encontrada con una menor expresión en los casos, lo que podría estar afectando procesos como migración y estructura neuronal, teniendo también implicaciones a nivel de regulación de las funciones cognitivas, muchas de las cuáles suceden en la CPFDL.

La INA tuvo una expresión menor en los casos, lo que podría estar ocasionando respuestas como las acumulaciones anormales de neurofilamentos o en el transporte axonal y, con ello, en procesos involucrados en el neurodesarrollo, comunicación sináptica y organización del citoesqueleto.

De esta manera, se propone a estas últimas proteínas como candidatas en la patología del suicido por su alta importancia en el mantenimiento de ciclo celular y de la organización y estructura en el desarrollo de la corteza cerebral, así como en la regulación de procesos apoptóticos y de transporte y crecimiento axonal.

9.2.4. Modelo de integración biológica

Alteraciones en la expresión de estas proteínas, ya sea mayor o menor, pueden generar cambios en estos procesos biológicos tan relevantes en el SNC.

De manera general, se propone un desbalance en la CPFDL a diversos niveles, los cuáles pueden estar estrechamente relacionados o ser respuesta ante la alteración particular de otro.

Los procesos disfuncionales mayormente encontrados para las 12 proteínas expresadas diferencialmente en los casos corresponden a respuesta a radicales libres y REDOX, procesos que se han relacionado con múltiples enfermedades tanto neurodegenerativas, como psiquiátricas. Como se enunció en párrafos anteriores, se puede encontrar en la literatura que alteraciones en estos procesos generan estrés oxidante, inflamación, estrés térmico, etc. por lo que se sugieren como los posibles potenciadores o detonantes de la respuesta global que se ve en los resultados aquí reportados.

Por otro lado, también se analizaron procesos biológicos implicados en el neurodesarrollo, los cuáles no se están sucediendo de manera normal, sin embargo, no es posible esclarecer desde qué momento del neurodesarrollo se están viendo estas alteraciones, incluso estas podrían ser previas a las demás respuestas y estar detonando el estrés oxidante o el déficit a la respuesta ante radicales libres y, de esta manera, estar generando una respuesta en cadena que pueda estar modulando la fisiopatología del suicidio. En la Fig. 18 se muestra el modelo de integración biológica que plantea este trabajo.

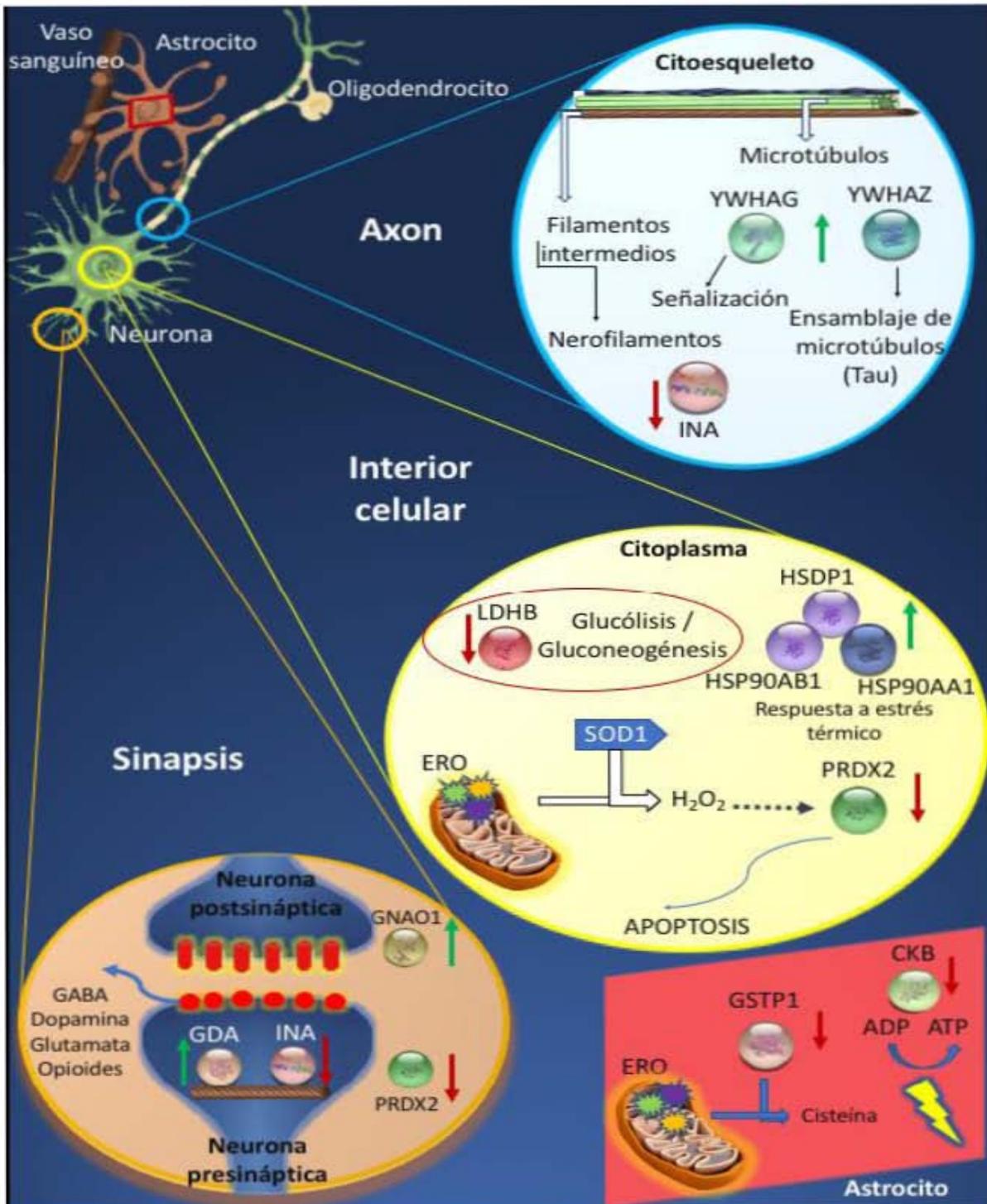


Figura 18. Interpretación biológica de las proteínas candidatas en la biología del suicidio. Se observan las proteínas y la expresión a la alta (flechas verdes) o a la baja (flechas rojas) en las diferentes regiones de las diversas células del SNC.

X) Conclusiones

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de proteínas de la corteza prefrontal dorsolateral de individuos que consumaron el suicidio respecto a individuos que murieron por otras causas.
- Se identificaron 12 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 6 tuvieron una mayor expresión y 6 una menor expresión respecto a los controles.
- En términos generales, se sugiere un desequilibrio en la bioquímica del proteoma de individuos que se suicidaron, siendo factibles afecciones en procesos altamente relevantes como la respuesta a radicales libres y estrés oxidante (REDOX); procesos biológicos involucrados en la homeostasis bioenergética y de desintoxicación del cerebro que posiblemente conducirían a inflamación, fallas energéticas y metabólicas que, eventualmente, desencadenarían diversas consecuencias en este órgano y en su funcionamiento.
- Por otra parte, estas proteínas también participan en procesos de neurodesarrollo, los cuáles abarcan desde la formación anatómica *per se*, hasta el transporte y crecimiento axonal, así como la regulación de procesos apoptóticos.
- Adicionalmente, dichas proteínas participan en procesos citoarquitectónicos, de ciclo celular y de comunicación sináptica, por lo que las diferencias de expresión podrían estar modulando la fisiopatología del suicidio a través de las diversas respuestas y cascadas de señalización que cumplen en los procesos biológicos anteriormente mencionados.

XI) Limitaciones

La mayor limitación del presente estudio fue el número de muestras analizadas, consideramos que es necesario replicar estos hallazgos en cohortes mayores, sin embargo, para contrarestrar este problema, las muestras incluidas en este estudio fueron caracterizadas a profundidad y pareadas entre casos y controles, lo que que permitió arrojar información novedosa desde el punto de vista biológico y molecular.

XII) Perspectivas a futuro

Este es el primer estudio en población mexicana que busca acercarse a un entendimiento del suicidio desde la perspectiva del análisis completo de las proteínas de una de las regiones del circuito cerebral asociado a este problema de salud pública. Por lo anterior, los resultados que aquí se presentan pueden servir como referencia para nuevas investigaciones acerca de este fenómeno multifactorial.

Con este escenario, los próximos estudios deberán profundizar en otras regiones del cerebro asociadas al circuito del suicidio (como la corteza orbitofrontal), lo que permitiría corroborar que estos resultados tienen un papel importante no sólo en la dinámica de la CPFDL, sino en diversas regiones cerebrales.

También es necesaria la implementación de más técnicas que permitan un estudio más detallado del proteoma cerebral, así como un complemento a los métodos que se usaron durante esta investigación. Desde agregar técnicas cuantitativas como DIGE y/o iTRAQ en geles bidimensionales, hasta la separación de proteínas mediante técnicas más específicas como cromatografía de exclusión molecular, de intercambio iónico, etc. sin olvidar, por supuesto, los métodos de validación.

No obstante, es necesario también ampliar los enfoques moleculares a distintos niveles, por ejemplo, el genómico, transcriptómico y metabolómico. Lo anterior con

el fin de confirmar que lo que está pasando a nivel de proteínas está siendo influenciado por genes o transcritos y, a su vez, repercutiendo en metabolitos.

Complementariamente y en virtud de que el crecimiento de estas investigaciones va de la mano del desarrollo computacional y de las bases de datos, es necesaria la intervención de la bioinformática y de la biología computacional, herramientas que pueden respaldar también los diversos resultados que se obtengan en los nuevos trabajos con las múltiples direcciones y enfoques con los que se puede trabajar.

Finalmente, el aumento en el número de muestras para ambas condiciones es de gran importancia para corroborar la reproducibilidad de estos resultados y aumentar la robustez de los mismos.

XIII) Referencias

1. Andrade, J. (2012). *Aspectos psicosociales del comportamiento suicida en adolescentes*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Revista Electrónica de Psicología Iztacala. Vol. 15 No. 2. Pp: 688-721.
2. Aranyi, G. Pecune, F. Charles, F. Pelachaud, C. Cavazza, M. (2016). Affective Interaction with a Virtual Character Through an fNIRS Brain-Computer Interface. *Frontiers in Computational Neuroscience*. Vol. 10. Pp: 1-14.
3. BioRad. (2018). How to cast your gels fast. Recurso en línea desde <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10042306.pdf> extraído el 15 de junio de 2018.
4. Boersema, P. Kahraman, A. Picotti, P. (2015). *Proteomics beyond large – scale protein expression analysis*. *Current opinion in Biotechnology*. Vol: 34 Pp: 162 – 170.
5. Bondy, B. Schlicht, K. Büttner, A. Siedler, F. Scheffer, B. Zill, P. Eisenmenger, W. Ackenheil, M. (2007). *Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls*. *Journal of Psychiatric Research* Vol. 41. Pp: 493-501.
6. Bonvento, G. Valette, J. Flament, J. Mochel, F. Brouillet, E. (2017). Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Pp. 1 -17.
7. Borges, G. Benjet, C. Orozco, R. Medina-Mora, ME. (2016). *The growth of suicide ideation, plan and attempt among young adults in the Mexico City Metropolitan area*. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*. Pp: 1-9.
8. Borges, G. Orozco, R. & Medina, M. (2012). *Índice de riesgo para el intento suicida en México*. *Salud Pública de México*, 54(6), 595-606. Recuperado el 12 de enero de 2018, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342012000600008&lng=es&tlng=es.

9. Bozorgmehr, A. Ghadirivasfi, M. Ananloo, ES. (2017). Obsessive-compulsive disorder, which genes? Which pathways? An integrated holistic view regarding OCD and its complex genetic etiology. *Journal of Neurogenetics*. 31 (3) Pp. 153-160.
10. Bridges, D. Moorhead, GB. (2005). 14-3-3 proteins: A number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2005: re10.
11. Burbaeva, G. Savushkina, O. Boksha. I. (2003). Creatine kinase BB in brain in schizophrenia, *The World Journal of Biological Psychiatry*, 4:4, 177-183, DOI: 10.1080/15622970310029916.
12. Cairns, N. Zhukareva, V. Uryu, K. et al. (2004). alpha-internexin is present in the pathological inclusions of neuronal intermediate filament inclusion disease. *The American Journal of Pathology*. Vol. 164. Pp. 2153-2161
13. Camprubí – Rimblas, M. Artigas, A. Guillamat – Prats, R. (2015). *An Overview of proteomics on Sepsis*. *Journal of Physical chemistry and Biophysics*. Vol: 5. Pp. 1-6.
14. Chan, MK. Tsang, TM. Harris, LW. Guest, PC. Holmes, E. Bahn, S. (2010). Evidence for disease and antipsychotic medication effects in post-mortem brain from schizophrenia patients. *Molecular psychiatry*. 16 (12). Pp. 1189-1202.
15. Chandramouli, K. y Yuan-Qian, P. (2009). *Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity*. *Human Genomics and Proteomics*. Vol: 2009. Pp: 1-22.
16. Cho, William. (2007). *Proteomics Technologies and Challenges*. *Geno. Prot. Bioinfo*. Vol. 5. No. 2.
17. Choudary, P.V., Molnar, M., Evans, S.J., Tomita, H., Li, J.Z., Vawter, M.P., et al., (2005). Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (43), 15653–15658.

18. Ciborowski, P. Silberring, J. (2016). *Proteomic profiling and analytical chemistry*. The crossroads. Elsevier. Amsterdam, Neetherlands. Second edition. Pp. 77-79.
19. Cornell, B. Wachi, T. Zhukarev, V. Toyo-oka, K. (2016). Overexpression of the 14-3-3gamma Protein in Embryonic Mice Results in Neuronal Migration Delay in the Developing Cerebral Cortex, *Neuroscience Letters* <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.009>
20. Cox, J. y Mann, M. (2011). Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology. *The Annual Review of Biochemistry*.
21. Cummins, P.M., Dowling, O. y O'Connor, B.F. (2011). *Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase Protein Chromatography*. In: Walls D, Loughran ST, editors: Humana Press. Pp 215-228.
22. Dalle - Donne, I. Giustarini, D. Rossi, R. Miulzani, A. Colombo, R. (2004). S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 8, No 2, 2004 Pp. 201-212
23. Davaliev, K. Kostovska, I. Dwork, A. (2016). Proteomics research in Schizophrenia. *Frontiers in cellular neurosciences*. 10, 18. <http://doi.org/10.3389/fncel.2016.00018>
24. Davies KJ (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium* 61, 1–31.
25. Dombroski, B. Nayak, R. Ewens, K. Ankener, W. Cheung, V. Spielman, R. (2010). Gene expression and genetic variation in response to endoplasmatic reticulum stress in human cells. *AJHG. Cell Press*. Vol. 86. Pp: 719-729.
26. Dringen, R. Brandmann, M. Hohnholt, M. Blumrich, E. (2015). Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochemical Research*. Vol. 40. Pp: 2570-2582.
27. Ducasse, D. Courtet, Ph. Jaussent, I. Genty, C. Dupuy, A.M. Guillaume, S. Olié, E. (2015). Increased CRP levels may be a trait marker of suicidal attempt. *European Neuropsychopharmacology* Vol. 25. Pp. 1824-1831.

28. Dunham, W. Mullin, M. y Gingras, A-C. (2012). Affinity purification coupled to Mass Spectrometry: Basic Principles and Strategies. *Journal of Proteomics*. Vol: 12. Pp. 1576-1590.
29. English, J. Pennington, K. Dunn, M. Cotter, D. (2011). The neuroproteomics of Schizophrenia. *Society of Biological Psychiatry*. Vol. 69. Pp: 163-172.
30. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (2016). Recurso en línea desde <http://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/390.pdf> extraído el 9 de mayo de 2018.
31. Feder ME, Hofmann GE. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. Vol.61. Pp. 243–282.
32. Feliciano, A. Milic Torres, V. Váz, F. Carvalho, A. Matthiesen, R. Pinto, P. Malhotra, A. Bárbara, C. Penque, D. (2015). Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine*. Pp. 437 – 445.
33. Filomeni G, Ciriolo MR (2006). Redox control of apoptosis: an update. *Antioxidants and Redox Signaling* 8, 2187–2192.
34. Fiori, LM. Turecki, G. (2012). Broadening our horizons: genes expression profiling to help better understand the neurobiology of suicide and depression. *Neurobiol Dis*; Vol. 45. Pp: 14-22.
35. Foote, M. Zhou, Y. (2012). 14-3-3 proteins in neurological disorders. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 3(2). Pp. 152-164.
36. Friedman, D.B. Hoving S. Westermeier, R. (2009). Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods of Enzymology*. Vol: 463. Pp. 515-540.
37. Furczyk, K. Schutová, B. Michel, T. Thome, J. Büttner, A. (2013). The neurobiology of suicide - A review of post - mortem studies. *Journal of Molecular Psychiatry*. 1:2. Pp: 1-22.
38. Gawryluk, J. Wang, J-F. Andreatza, A.C. Shao, L. Yatham, L. Young, L (2011). Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia, *International Journal*

- of Neuropsychopharmacology*, Volume 14, Issue 8, 1 September 2011, Pages 1069–1074, <https://doi.org/10.1017/S1461145711000617>
39. Görg, A. Drews, O. Lück, C. Weiland, F. Weiss, W. (2009). 2-DE with IPGs. Wiley Interscience. Discovering something great. *Electrophoresis Journal*. Vol. 30. Pp. 122-132.
40. Görtz, AL. Peferoen, L. Gerritsen, W. Van Noort, J. Bugiani, N. Amor, S. (2017). Heat shock protein expression in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy reveals astrocyte stress prior to myelin loss. doi: 10.1111/nan.12399
41. Graves, P. R., & Haystead, T. A. J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 39–63. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002>.
42. Gu, F. Chahuan, V. Chahuan, A. (2014). Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Vol. 18. Pp: 89-95.
43. Hashimoto, K. Shimizu, E. Masaomi, L. (2005). Dysfunction of glia-neuron communication in pathophysiology of schizophrenia. *Current Psychiatry Reviews*. Vol 1. Pp: 151-163
44. Hayley, S. L, Du. Litteljohn, D. Palkovits, M. Faludi, G. Merali, Z. Poulter, M. Anisman, H. (2015). Gender and brain regions specific differences in brain derived neurotrophic factor protein levels of depressed individuals who died through suicide. *Neuroscience Letters*, Volume 600, Pages 12-16.
45. Hillis, D. M., Sadava, D., Craig Heller, H., Price, M. V. (2012). Principles of life. Sinauer Associates, Inc. United States of America. Pp: 39-44.
46. Huertas, R. (2001). Historia de la psiquiatría, ¿por qué? ¿para qué? Tradiciones historiográficas y nuevas tendencias. *Frenia*, ISSN 1577-7200, Vol. 1, Fascículo 1, 2001, pags. 9-36.
47. I-Chung, Lu. Chuping, Lee. Yuan-Tseh, Lee. Chi-Kung, Ni. (2015). Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization. *Annual Review of Analytical Chemistry*.

48. Iglesias, I. (2010). Caracterización bioquímica y molecular del sistema antioxidante peroxirredoxina-sulfirredoxina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada.
49. Jiang, M. Bajpayee, N. S. (2009). Molecular Mechanisms of Go Signaling. *Neuro-Signals*, 17(1), 23–41.
50. Jollant, F. Buresi, C. Guillaume, S. Jausse, I. Bellivier, F. Leboyer, M. Castelnau, D. Malafosse, A. Courtet, P. (2004). The Influence of four serotonin-related genes on decision-making in suicide attempter. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* Vol. 144. Pp: 615-624.
51. Joncquel-Chevalier Curt, M.. Voicu, P.-M. Fontaine, M. Desein, A.F. Porchet, N. Mention-Mulliez, K. Dobbelaere, D. Soto-Ares, G. Cheillan, D. Vamecq, J. (2015) Creatine biosynthesis and transport in health and disease, *Biochimie*, doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.022.
52. Kadowaki, H. Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*. Vol. 4 (3). Pp: 306-333.
53. Kazuno, A. Ohtawa, K. Otsuki, K. Usui, S. Sugawara, H. Okazaki, Y. Kato, T. (2013). Proteomic analysis of lymphoblastoid cells derived from monozygotic twins discordant for bipolar disorder: A preliminary study. *PLOS ONE* 8(2): e:53855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053855>
54. Kékesi KA, Juhász G, Simor A, Gulyássy P, Szegő ÉM, et al. (2012) Altered Functional Protein Networks in the Prefrontal Cortex and Amygdala of Victims of Suicide. *PLOS ONE* 7(12): e50532.
55. Kim, S., Choi, K.H., Baykiz, A.F., Gershenfeld, H.K., (2007). Suicide candidate genes associated with bipolar disorder and schizophrenia: an exploratory gene expression profiling analysis of post-mortem prefrontal cortex. *BMC Genomics* 8, 413.
56. Kim, S. K., Kang, S. W., Chung, J.-H., Park, H. J., Cho, K. B., & Park, M.-S. (2015). Genetic Polymorphisms of Glutathione-Related Enzymes (*GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*) and Schizophrenia Risk: A Meta-

- Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19602–19611.
<http://doi.org/10.3390/ijms160819602>
57. Klempan, T.A., Rujescu, D., Merette, C., Himmelman, C., Sequeira, A., Canetti, L., et al., (2009). Profiling brain expression of the spermidine/spermine N (1)-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 150B (7), 934–943.
58. Kumar, A. Dhull, D. Gupta, V. Channana, P. Singh, A. Bhardwaj, M. Ruhel, P. Mittal, R. (2016). Role of Glutathione S- transferases in neurological problems. *Jorunal of Expert Opinion of Therapeutic Patents*. DOI: 10.1080/13543776.2017.1254192.
59. Kumar, N. Kumar, N. Das, M. Bhargava, K. (2012). Proteomic evaluation of antioxidant activities of NAP peptide in rat brain cortex exposed to chronic hypobaric hypoxia. *Journal of Proteins and Proteomics*. 3 (3) Pp. 217-228.
60. Le-Niculescu, H. Levey, DF. Ayalew, M. (2013). Discovery and validation of blood biomarkers for suicidality. *Molecular Psychiatry*. Vol.18; Pp: 1249-1264.
61. Lemma-Gray P, Valuřová E, Carroll CA, Weintraub ST, Musatov A, Robinson NC. (2008). Subunit analysis of bovine heart complex I by reversed-phase high-performance liquid chromatography, electrospray ionization-tandem mass spectrometry, and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*; 382 (2): 116-21.
62. Lenz, C., & Dihazi, H. (2016). Introduction to Proteomics Technologies. *Methods in Molecular Biology*. 1362. 3-27. 10.1007/978-1-4939-3106-4_1.
63. Lescuyer, P. Bianchi, L. Hochstrasser, D. Bini, L. Sanchez, JC. (2012). Translational Proteomics. *Journal of Proteomics*
64. Lin, M. Zhao, D. Hrabovsky, A. Pedrosa, E. Zheng, D. Lachman, H. (2014). Heat shock alters the expression of schizophrenia and autism candidate genes in an induced pluripotent stem cell model of the human encephalon. *PLoS ONE* 9(4): e94968. doi:10.1371/journal.pone.0094968
65. Li, Z. Zhou, X. Dai, Z. Zou, X. (2012). Classifications of G proteins and prediction of GPCRs-G proteins coupling specificity using continuous wavelet transform and information theory. *Amino Acids*. 43 (2). Pp:793-804.

66. Mallei, A. Failler, M. Corna, S. Racagni, G. Mathé, A. Popoli, M. (2015). Synaptoproteomic analysis of a rat gene-environment model of depression reveals involvement of energy metabolism and cellular remodeling pathways. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. Pp: 1-21.
67. Mann, J. (2003). Neurobiology of suicidal behavior. *Nature reviews. Neuroscience*. Vol. 4. Pp. 819-828.
68. Martins de Souza, D. Gattaz, W. Schmitt, A. Maccarrone, G. et al. (2009). Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *Journal of Psychiatry Research*. Vol. 43. Pp. 978 - 986.
69. Mayolo - Deloisa, K. Martínez, L. y Rito – Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 11. No. 3. Pp: 415-429.
70. Medina, J.A. (2013). Procesamiento automatizado de datos proteómicos: Desde la espectrometría de masas al conocimiento biológico. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.
71. Morales, D. Gallo, L. (2006). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: Plataformas de Proteómica. Recurso en línea desde http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf extraído el 13 de abril de 2018.
72. Mercé-Grau, A. Dalton, J. López-Pizón, J. García-Jiménez, M. Monge-Galindo, L. Cuenca-León, E. Giraldo, J. Macaya, A. (2016). GNAO1 encephalopathy: further delineation of a severe neurodevelopmental syndrome affecting females. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 11:38.
73. Moriya, H. (2015). Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular Cell Biology*. Vol. 26. Pp. 3932-3939.
74. Norris, J. y Caprioli, R. (2013). Imaging Mass Spectrometry: A New Tool For Pathology on a Molecular Age. *Proteomics Clin Appl*. Vol: 7 Pp: 733-738.

75. Organización Mundial de la Salud (2015) Suicidio. Recurso en línea, extraído de página oficial <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs398/es/> el 20 de noviembre de 2017.
76. Pertuz, Y. González, G. Acosta, S. (2016). Uso de biomarcadores de inflamación o infección en el diagnóstico de sepsis, en unidades de cuidados intensivos de Santa Marta, Colombia. *Revista Biosalud*; Vol: 15(2) Pp. 28-36.
77. Pimienta, H. (2004). La corteza cerebral más allá de la corteza. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, Suplemento No. 1, Vol. XXXIII.
78. Plascencia, G. (2003). Espectrometría de Masas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Curso de Métodos. Recurso en línea desde http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf extraído el 22 de mayo de 2018.
79. Rabilloud, T. Lelong, C. (2011). Two – Dimensional Gel Electrophoresis in Proteomics: A Tutorial. *Journal of Proteomics*. Vol: 74. Pp. 1829-1841.
80. Reyes, J.P. (2018). Introducción a la Proteómica Médica: Métodos de Separación y Purificación de Proteínas. Recurso en línea desde https://sae.inmegen.gob.mx/tema/formacion/upload/2018/8_M%C3%A9todos_de_Separaci%C3%B3n_y_Purificaci%C3%B3n_de_prote%C3%ADnas.pdf extraído el 9 de mayo de 2018.
81. Rhee, SG. (2006). H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. Vol. 312. Pp. 1882-1883
82. Ritchie, C. (2012). Revisión exhaustiva sobre cromatografía en columna para la purificación de proteínas. *Research*, una revista de acceso libre. *Mater Methods*. Recurso en línea desde <http://www.labome.es/method/Protein-Purification.html> extraído el 9 de mayo de 2018.
83. Salman, G. (2011) Futuro imperfecto: Dimensión hermenéutico-simbólica del suicidio en la obra de Jorge Semprún. México, D.F.
84. Salzano, S. Checconi, P. Hanschmann, EM. *et al.* (2014). Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *PNAS*. Vol. 33. Pp.12157--12162.

85. Segovia, L., y Soberón, X. (2007). Evolución experimental de proteínas. *Revista de Biotecnología*, Vol. 14. Pp. 291-301.
86. Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M.P., Bunney, W.E., Klempan, T., et al., (2009). Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS ONE* 4 (8), e6585.
87. Serafian, T. Verity, M. Vinters, H. Shih, C. Shi, L. Ji, X. (1999). Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *Neurosciences Research*. Vol: 56. Pp. 206-212.
88. Solomon, E. P., Berg, L. R., Martin, D. W. (2011). *Biology*. Cengage Learning, Inc. United States of America. Pp: 60-68.
89. Sourkes, T. L. (1961). The Biochemistry of Mental Disease *Canadian Medical Association Journal*, 85(9), 487–490.
90. Sreekumar KR, Huang Y, Pausch MH, Gulukota K. (2004). Predicting GPCR-G protein coupling using hidden Markov models. *Bioinformatics* 20:3490–3499
91. Stepanova, A. Konrad, C. Manfredi, G. Ten, V. Galkin, A. (2018). Reactive Oxygen species production by brain mitochondria depends linearly on oxygen level. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 120.
92. Sun, K. Chang, K. Clawson, S. Gosh, S. Mirzaei, H. Regnier, F. Shah, K. (2011). Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 118. Pp: 902-914.
93. Swaab, D.F. Zhao, J. Verwer, R.W.H. Van Wamelen, D.J. Qi, X. Gao, S. Lucassen, P.J. (2016). Prefrontal changes in the glutamate-glutamine cycle and neuronal/glial glutamate transporters in depression with and without suicide. *Journal of psychiatric Research*. Vol. 82. Pp: 8-15.
94. Tanaska, SC. Doya, K. Okada, G. Ueda, K. Okamoto, Y. Yamawaki, S. (2004). Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nature Neuroscience*. Vol. 7. Pp: 887-893.

95. Tew, K. (2007). Redox in redux: Emergent roles for glutathione S - transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Journal of Biochemical Pharmacology*. Vol. 73. Pp: 1257 - 1269.
96. The Human Protein Atlas, recurso en línea dese <https://www.proteinatlas.org/> extraído el 15 de octubre de 2018.
97. Thul, P. Akesson, L. Wiking, M. Mahdessian, D. Geladaki, A. Ait Blal, H. *et al.* (2017). A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science*. DOI: 10.1126/science.aal3321
98. Tóth, M. Gombos, I. Sántha, M. (2015). Heat shock proteins and their role in human diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. Vol. 59. Pp. 121-141.
99. Tovilla-Zarate, C. A., Genis Mendoza, A. D., (2012). Los Genes, el sistema serotoninérgico y la conducta suicida. *International Journal of Psychological Research*, 5(1), 52-58
100. Turecki, G. (2014) The molecular bases of the suicidal brain. *Review. Nature*. 15. 802-817.
101. Van Heeringen, K. (2012). Stress-diathesis model of suicidal behavior. In: Dwivedi Y, ed. *The neurobiological basis of suicide*. Boca Raton: CRC Press. Pp. 113-125.
102. Van Heeringen, K. Mann, JJ. (2014). The Neurobiology of Suicide. *The Lancet Psychiatry*. Vol.1. Pp. 63-72.
103. Wachi, T. Cornell, B. Marshal, C. Zhukarev, V. Baas, PW, Toyo-oka, K. (2015). Ablation of the 14-3-3gamma protein results in neuronal migration delay and morphological defects in the developing cerebral cortex. *Developmental Neurobiology*. Vol. 76. Pp. 600-614.
104. Wachi, T. Cornell, Toyo-oka, K. (2017). Complete ablation of the 14-3-3-epsilon protein results in multiple defects in neuropsychiatric behaviors. *Behavioural Brain Research*. Vol. 319. Pp. 31-36.
105. Williams, TA. Mars, AE. Buyske, SG. *et al.* Risk of Autistic Disorder in Affected Offspring of Mothers with a Glutathione S-Transferase P1 Haplotype (2007) . *Arch Pediatr Adolesc Med*;161(4):356–361. doi:10.1001/archpedi.161.4.356

106. Wright, P.C. Noirel, J. Ow, S-Y. Fazeli, A. (2012). A Review of current Proteomics technologies with a survey on widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology*. Pp: 738 – 765.
107. Yuan, A. Sershen, H. Veerana, Basavarajappa, BS, Kumar, A. Berg, M. Lee, J-H, Sato, Y. Rao, MV. Mohan, PS, Dyakin, V. Julien, J-P. Lee, VM. Nix, RA. (2015). Neurofilament subunits are integral components of synapses and modulate neurotransmission and behavior in vivo. *Molecular Psychiatry*. Pp. 1-9.
108. Zachery, RG. Ying-Hua, C. Ying, G. (2014). Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Eur J Physiol*. Vol: 466. Pp. 1199-1209.
109. Zeida, A. (2015). Estructura y mecanismo de acción de peroxirredoxinas: estudio teórico y experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
110. Zhang, Y, Chen, K, Sloan, SA, et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. Vol. 34. Pp.11929–11947