



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,

Odontológicas y de la Salud

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR EN EL
PROTEOMA DE SALIVA**

TESIS DE INVESTIGACIÓN

QUE OPTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

PRESENTA

José Guillermo Villagómez Olea

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis

Facultad de Odontología

MIEMBROS DE COMITÉ TUTORAL

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta

Facultad de Odontología

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Facultad de Medicina

Dr. Higinio Arzate

Facultad de Odontología

Dr. David Velázquez Fernández

Facultad de Medicina

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Introducción	9
ANTECEDENTES	11
Saliva como medio diagnóstico.....	11
<i>Anatomía de las glándulas salivales, clasificación, secreción y función de la saliva y sus constituyentes proteicos.</i>	11
<i>Diagnósticos salivales. Un emergente campo de investigación.</i>	13
<i>¿Por qué estudiar proteínas?</i>	14
<i>Proteómica Salival</i>	14
<i>Bases de Datos de Proteoma y proteínas salivales.</i>	17
<i>Orígenes y presencia en saliva de biomarcadores para enfermedades distantes de cavidad bucal, en particular cánceres.</i>	17
ANTECEDENTES DE CÁNCER PULMONAR.....	21
<i>Factores de Riesgo para cáncer pulmonar</i>	21
<i>Clasificación del cáncer pulmonar, estadificación, tratamiento y pronóstico</i>	22
<i>Estadificación</i>	23
<i>Estudios de tamizaje para cáncer de pulmón</i>	25
<i>Bases moleculares del cáncer de pulmón</i>	26
<i>Perfiles y biomarcadores moleculares en cáncer</i>	30
<i>Clasificación de los biomarcadores en cáncer</i>	30
<i>Búsqueda de biomarcadores: metodologías, ventajas y desventajas.</i>	31
<i>Biomarcadores reportados para cáncer de pulmón en tejidos y biofluidos</i>	31
<i>Antecedentes de biomarcadores para cáncer de pulmón en saliva</i>	35
JUSTIFICACION	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPOTESIS.....	39
OBJETIVO GENERAL.....	40
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	40
METODOLOGIA.....	41
<i>Tipo de estudio</i>	41
<i>Criterios de Selección</i>	42
<i>Criterio de Eliminación</i>	42

<i>Criterios de Inclusión</i>	43
<i>Criterio de Eliminación</i>	43
<i>Toma de muestra, procesamiento y almacenamiento</i>	44
<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	44
<i>Realización de geles bidimensionales, tinción, análisis de expresión diferencial e indentificación por espectrometría de masas</i>	46
<i>Electroforesis bidimensional</i>	46
<i>Tinción, escaneo de geles bidimensionales para detectar puntos diferencialmente expresados</i> .	47
<i>Espectrometría de masas</i>	47
<i>Búsqueda bioinformática</i>	48
<i>Realización de ensayo ELISPOT</i>	49
<i>Realización de ensayo ELISA</i>	49
<i>Pruebas estadísticas realizadas</i>	50
RESULTADOS	51
<i>Protocolo de colección, procesamiento y almacenamiento de muestras de saliva</i>	51
<i>Fase descubrimiento</i>	52
<i>Geles bidimensionales</i>	53
<i>Espectrometría de Masas e Identificación por Protein Pilot</i>	58
<i>Fase de Validación</i>	69
<i>Validación de proteínas a través de experimentos ELISPOT y ELISA</i>	69
<i>Grupo independiente para validación</i>	70
DISCUSION.....	78
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA.....	83
APENDICE	87

Índice de figuras

Figura 1 .Esquema y disposición de los tipos de células que conforman a las glándulas salivales.....	12
Figura 2. Localización anatómica de las glándulas salivales mayores	12
Figura 3. . Principales grupos de proteínas presentes en la saliva y funciones en relación a la homeostasis de la cavidad bucal.....	13
Figura 4. Principales grupos de proteínas salivales resueltos en un gel bidimensional	15
Figura 5. Simulación de un mapa 2D de muestra donde el rango del punto isoeléctrico y el peso molecular de las clases más abundantes de proteínas salivales son reportadas como puntos.	16
Figura 6. Diversos mecanismos de transporte de moléculas hacia la saliva.	18
Figura 7. Posible origen y presencia en saliva de biomarcadores para tumores distantes de cavidad bucal.	19
Figura 8. Características histopatológicas diferenciales entre un pulmón normal y pulmón con cáncer pulmonar de células no pequeñas (Carcinoma de células escamosas y Adenocarcinoma).....	23
Figura 9. Diagrama de distribución de la muestra (123 individuos) para la estrategia para la identificación y validación de las proteínas de interés.....	42
Figura 10. Diagrama de la preparación para la extracción y solubilización de proteínas a partir de las muestras de saliva en la fase descubrimiento y validación.	45
Figura 11 Ejemplo gráfico de disposición gráfica de los controles negativos y una muestra por triplicado para la realización de los ensayos ELISA.	50
Figura 12. . Gel SDS-PAGE para valoración de integridad de las muestras de saliva de 4 sujetos voluntarios.....	51
Figura 13. Geles bidimensionales de <i>mezcla</i> de sujetos fumadores sin cáncer (A) y de sujetos fumadores con cáncer (B).	54
Figura 14. Geles bidimensionales de <i>mezcla</i> de sujetos fumadores sin cáncer (A) y de sujetos fumadores con cáncer (B).	55
Figura 15. 20 puntos presentes en el gel del grupo de sujetos fumadores (6) con adenocarcinoma pulmonar que fueron escindidos para posterior análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).....	56
Figura 16. Geles bidimensionales de un sujeto control (D) y un sujeto caso (E).	57
Figura 17. Identificación de Anexina A1 en el punto 17 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.....	62
Figura 18. Identificación de Anexina A1 en el punto 19 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.....	63
Figura 19. Identificación de Calicreína-1 en el punto 8 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.....	65
Figura 20. Identificación de Calreticulina en el punto 8 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.....	66
Figura 21. Identificación de Calreticulina en el punto 9 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.	67
Figura 22. Proteínas identificadas en gel bidimensional de <i>mezcla</i> de sujetos fumadores con adenocarcinoma pulmonar que fueron incluidos como parte de la fase descubrimiento de este estudio.	68
Figura 23. Ensayos ELISPOT para valorar la presencia de las muestras en 4 sujetos clasificados entre las distintas categorías que se utilizaron en validación independiente.	69
Figura 24. Placas representativas de 3 anticuerpos utilizados para la fase de validación.....	71
Figura 25. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Anexina –A1.....	75
Figura 26. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Calicreína-1.....	76
Figura 27. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Calreticulina.....	77

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación TNM para los estadios de CPCNP	24
Tabla 2. Recomendaciones generales de tratamiento para CPCNP de acuerdo al estadio	25
Tabla 3. Biomarcador diagnóstico proteómico candidato para CP identificado en muestras de tejido	33
Tabla 4. Biomarcadores diagnóstico proteómicos para cáncer de pulmón identificados en muestras de biofluidos.	34
Tabla 5. Fumadores con adenocarcinoma pulmonar	52
Tabla 6. Fumadores sin adenocarcinoma pulmonar	52
Tabla 7. Perfiles de los sujetos	53
Tabla 8. Proteínas identificadas en los puntos indicados, nombre del gen, el número de acceso, el porcentaje de cobertura de cada una, el número de péptidos identificados, el ProtScore y el UnUsedScore, el punto isoeléctrico	59
Tabla 9. Perfiles clínicos, demográficos y experimentales de los sujetos	70
Tabla 10. Datos estadísticos generales sobre concentración de proteínas y absorbancia de 3 anticuerpos de interés experimental	71
Tabla 11. Media y Mediana de absorbancia para las tres proteínas de interés	72
Tabla 12. Test de Shapiro Wilk	72
Tabla 13. Test de Kruskal Wallis para las 3 proteínas de interés	72
Tabla 14. Prueba de Tukey para Anexina A1	73
Tabla 15. Prueba de Tukey para Calicreína 1	73
Tabla 16. Prueba de Tukey para Calreticulina	74

Índice de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AJCC: *American Joint Commission on Cancer* (Comisión conjunta estadounidense para el cáncer)
CEA: *Carcinoembryonic antigen* (Antígeno carcinoembrionario)
CP: Cáncer de pulmón
CPCE: Carcinoma pulmonar de células escamosas
CPCNP: Cáncer pulmonar de células no pequeñas
CPCP: Cáncer pulmonar de células pequeñas
CT: Tomografía computarizada
DTT: Ditiotreitól
ELISA: *Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay*. (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.)
ELISPOT: *Enzyme-linked immunosorbent spot assay* (Ensayo de punto inmunoabsorbente ligado a enzima)
FCC: Fumador con cáncer
FSC: Fumador sin cáncer
GTP: Guanosina trifosfato
HAS: *Human serum albumin* (Albúmina de suero humano)
HSPP: *Human salivary proteome project* (Proyecto del proteoma saliva humano)
INCan: Instituto Nacional de Cancerología
INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica
iTRAQ: *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*
LC: *Liquid chromatography*. (Cromatografía líquida)
LDCT: *Low doses computed tomography*. Tomografía computada de baja dosis.
LOH: *Loss of heterozygosity* (Pérdida de heterocigocidad)
MALDI-TOF: *Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*
mL: mililitros
MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometría de masas)
MW: *Molecular weight*. Peso molecular.
NCI: *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Cáncer; Estados Unidos)
NFCC: No fumadores con cáncer
NFSC: No fumadores sin cáncer
NIDCR: *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (Instituto Nacional de investigación dental y craneofacial; Estados Unidos)
NIH: *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Salud; Estados Unidos)
NLST: National Lung Screening Trial
OPD: *o-Phenylenediamine (OPD) dihydrochloride* (o-fenilendiamina dihidroclorido)
PBS: *Phosphate buffered saline* (Buffer fosfato salino)
pI: Punto isoelectrico
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
PRP: Proteínas ricas en prolina
PTMS: *Post-translational modifications* (Modificaciones postraduccionales)
RNA: Ácido ribonucleico
SELDI: *Surface-enhanced laser desorption-ionization* (Espectroscopia de masas con desorción ionización láser incrementado en superficie)
TAC: *Computerized axial tomography* (Tomografía axial computarizada)
TCA: *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloroacético)
TNM: Sistema de estadificación del cáncer. T= extensión del tumor; N= Si las células han migrado a los ganglios linfáticos cercanos (regionales), y si ha ocurrido una metástasis (M) distantes a otras partes del cuerpo.
UCLA: *University of California, Los Angeles*
W-CIN: *Whole chromosomal instability*. Inestabilidad cromosómica global

Resumen

Antecedentes: La saliva es un medio diagnóstico emergente atractivo debido a su obtención poco invasiva, a diferencia del suero o tejido y porque se ha demostrado que puede servir tanto para la evaluación de condiciones locales como distantes del sistema que la origina. El cáncer de pulmón es la primera causa de mortalidad por cáncer tanto a nivel mundial como a nivel nacional, esto debido a que es asintomático en sus primeras etapas y a la falta de herramientas de diagnóstico temprano que sean sencillas y baratas. Existe evidencia que sugiere la posibilidad de encontrar proteínas asociadas a la presencia de esta enfermedad en el biofluido salival. Los análisis proteómicos permiten la evaluación global de proteínas expresadas por un sistema biológico en un momento dado. El acoplar estas herramientas al estudio del proteoma salival permite hacer comparaciones profundas y encontrar posibles biomarcadores que ayuden a desarrollar nuevas herramientas diagnósticas y abrir directrices a posibles pruebas de tamizaje de poblaciones en riesgo de padecer ciertas enfermedades, como en este caso, cáncer de pulmón.

Hipótesis: Mediante la comparación de perfiles de expresión del proteoma salival a través de un abordaje proteómico (Geles bidimensionales/ Espectrometría de Masas/ Inmunoensayos) en individuos con y sin adenocarcinoma pulmonar se identificarán y validarán (en una cohorte independiente) biomarcadores que discriminen entre ambas condiciones.

Objetivo: Identificar biomarcadores para adenocarcinoma pulmonar a través de seleccionar aquellos marcadores proteicos que se encuentren expresados en los grupos de pacientes con adenocarcinoma pulmonar mediante una estrategia proteómica basada en geles bidimensionales y espectrometría de masas.

Materiales y métodos: Se incluyeron 123 sujetos en el presente estudio. Se colectaron muestras de saliva de acuerdo a un protocolo establecido. Se utilizó como plataforma de abordaje la realización de geles bidimensionales y posterior espectrometría de masas para la separación e identificación del proteoma salival de sujetos con y sin cáncer pulmonar. Las proteínas identificadas solamente en sujetos con la enfermedad se sometieron a una posterior validación a través de inmunoensayos en un grupo independiente. Además, se sometió a estandarización distintos protocolos para la evaluación de este complejo proteoma.

Resultados: Se encontró una expresión diferencial de proteínas entre el grupo casos y controles al realizar los experimentos a través de geles bidimensionales y espectrometría de masas. En particular se encontraron tres proteínas con reporte de sobreexpresión en suero, tejido o líneas celulares de cáncer pulmonar: Calreticulina, Anexina A1, Calicreína-1. Al intentar validar estas proteínas mediante inmunoensayos no se logró corroborar su expresión diferencial.

Conclusiones: Es posible hallar un proteoma salival con expresión diferencial entre sujetos con y sin adenocarcinoma pulmonar. Sin embargo, las proteínas halladas en nuestro estudio no se

podieron validar probablemente debido a la complejidad y diversidad en la naturaleza de las proteínas estudiadas. Otra posibilidad es que hayan existido diferencias técnicas en las diferentes etapas del presente estudio y esto haya conducido a la falta de correlación de los hallazgos de una a otra fase del estudio.

Abstract

Background: Saliva is an emergent attractive diagnostic medium because it less invasive collection than obtaining serum or tissue and has shown that it can serve both for the evaluation of local and distant conditions from the system that originates it. Lung cancer is the global and national leading cause of cancer mortality, this is due it's an asymptomatic in its early stages and the lack of early simple and inexpensive diagnostic tools. The evidence suggests the possibility of finding proteins associated with the presence of this disease in the salivary biofluid. Proteomic analyzes allow the comprehensive evaluation of proteins expressed by a biological system at a given time. Coupling these tools to the study of salivary proteome allows deep comparisons and to find potential biomarkers to help find new diagnostic tools and open guidelines to potential population screening tests in risk of certain diseases like, in this case, lung cancer.

Hypothesis: By comparing expression profiles of salivary proteome through a proteomic approach (Two dimensional gels / Mass spectrometry/ immunoassays) in subjects with and without lung adenocarcinoma will lead to identified and validate a group of proteins that discriminate between the two conditions.

Objective: To identify biomarkers for lung adenocarcinoma through select those protein markers that is expressed in the groups of patients with lung adenocarcinoma using a strategy based in proteomics two dimensional gels and mass spectrometry.

Materials and Methods: 123 subjects were enrolled in this study. Saliva samples were collected according to an established protocol. A two dimensional gel and mass spectrometry platform was used for the separation and identification of salivary proteome of subjects with and without lung cancer. Proteins identified only in patients with the disease underwent subsequent validation through immunoassays in an independent group. Besides, we subjected to standardization the protocols for evaluating this complex proteome.

Results: We found a differential protein expression profile between cases and controls when two dimensional gels and mass spectrometry were performed. In particular were found three proteins with overexpression previous report in serum, tissue or cell line of lung cancer: Annexin A1, Kallikrein-1 and Calreticulin. When attempting to validate these proteins by immunoassays we did not confirm their differential expression.

Conclusions: It is possible to find a salivary proteome with differential expression between subjects with and without lung adenocarcinoma. However, the proteins found in our study probably could not be validated because of the complexity and diversity in the nature of the proteins studied. Another possibility is that there have been technical differences in the various

stages of this study and this has led to a lack of correlation between the findings of one or another study phase.

Introducción

A pesar de existir referencias desde la década de los sesenta, fue hasta principios del año 2000 que el uso de saliva como medio diagnóstico de condiciones sistémicas ha ganado gran atención, cuestión reflejada en el sustancial incremento de investigaciones realizadas en este campo emergente. Mientras que algunos autores afirman que se ha convertido en una historia exitosa de investigación traslacional otros postulan la necesidad de realizar investigaciones de carácter más fundamental; sin embargo, el punto en el que coinciden las perspectivas encontradas es que existe la evidencia científica para razonar que es viable encontrar moléculas presentes en este medio que sirvan para detectar y predecir la presencia de enfermedades tanto locales (bucales) como sistémicas (cáncer, enfermedad cardiovascular, etc.)

Probablemente la característica más atractiva del uso de saliva es la facilidad y simplicidad de obtención. Sin embargo se requiere del conocimiento previo y estandarización de un estricto protocolo con el fin analítico deseado.

Piedra angular del incremento en los estudios ha sido el refinamiento y robustecimiento de las tecnologías y herramientas ómicas, dentro de las cuales destaca la proteómica, como forma de estudio del conjunto de proteínas que son expresadas por un sistema biológico, pues esta herramienta permite el análisis simultáneo de miles de proteínas y que podrían representar potenciales biomarcadores e incluso blancos terapéuticos.

En particular (e incluyendo el presente trabajo) una de las metas más perseguidas actualmente es buscar biomarcadores y firmas moleculares para el diagnóstico de distintos tipos de cáncer, tanto local (bucal, glándulas salivales) como distante (mama, pancreático, pulmón, etc.)

Este proyecto se centra en específico en cáncer de pulmón, que es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, esto debido en parte a la naturaleza heterogénea y agresiva de la enfermedad y al alto porcentaje de diagnósticos tardíos en conjunto con la carencia de tratamientos que incrementen la sobrevida sustancialmente.

Por otra parte el hecho de que los sujetos diagnosticados en etapas tempranas tengan un alto porcentaje de sobrevivencia a la enfermedad pone en relevancia la necesidad de implementar programas de detección temprana en personas que se encuentren bajo riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia.

En el estudio(1) realizado por el *National Lung Cancer Screening Trial Research* se concluyó que mediante la realización de Tomografía Computada Helicoidal de baja dosis (*low dose- TAC*) en sujetos con alto riesgo de desarrollar cáncer pulmonar se logra efectivamente la

reducción (hasta en un 20%) de la mortalidad por cáncer de pulmón comparada con un grupo de referencia al cual sólo se les realizó solamente radiografías torácicas, por lo cual, se ha propuesto como herramienta ideal para realizar tamizajes a poblaciones en riesgo, sin embargo, la desventaja de usar TAC como herramienta de tamizaje es su alto costo, poniendo en relevancia la necesidad de buscar herramientas que podrían ayudar a identificar individuos en riesgo que requieran este tipo de estudio, donde el hecho de desarrollar una herramienta de detección oportuna a través de un medio más sencillo, fácil y barato de obtener, como en este caso sería la saliva, supondría una ventaja si se logra validar con un alto grado de sensibilidad y especificidad.

Este trabajo representa una prueba de concepto, para establecer si entre grupos de sujetos con cáncer de pulmón y grupos control se pueden determinar diferencias en las proteínas expresadas en saliva, cuestión que conllevaría a la identificación de potenciales biomarcadores y posibles firmas moleculares expresadas que sean como producto de la presencia de la enfermedad.

ANTECEDENTES

Saliva como medio diagnóstico

Anatomía de las glándulas salivales, clasificación, secreción y función de la saliva y sus constituyentes proteicos.

La embriogénesis de las glándulas salivales esta exquisitamente orquestada de tal manera que al nacimiento los órganos del sistema estén preparados para producir las secreciones salivales bajo control de la inervación autónoma.(2, 3)

Las glándulas salivales de mamíferos se encuentran compuestas principalmente de dos tipos de células epiteliales, las células acinares que secretan el fluido salival así como la mayoría de proteínas salivales, y las células ductales que secretan algunas cuantas proteínas y modifican la composición iónica de la saliva conforme fluye hacia la cavidad bucal, en un estroma de tejido conectivo. (2, 3)

Los acinos (células acinares agrupadas) son considerados como las unidades secretorias básicas y pueden ser clasificados como células serosas, que secretan el fluido acuoso desprovisto de mucinas, poseen un citoplasma acidófilo debido al alto contenido en enzimas, principalmente amilasas, sus núcleos se disponen en una posición más central que en las células mucosas y son más redondeados. Las células mucosas producen una secreción rica en mucina y carbohidratos, estas células presentan un citoplasma de aspecto claro puesto que su contenido no se tiñe con los colorantes comúnmente usados. Los núcleos se disponen en la parte basal y tienen un aspecto aplanado y finalmente células mixtas constituidas tanto por células serosas y mucosas.(2)

El sistema de glándulas salivales humanas puede ser dividido en dos grupos exocrinos distintos: Las glándulas salivales mayores que incluyen a las glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales. Juntos producen más del 90% de la saliva. Las glándulas sublinguales y submaxilares son glándulas mixtas (con acinos serosos y mucosos), mientras que la parótida es constituida principalmente por células serosa. Las glándulas menores son mucosas. Adicionalmente, la mucosa del tracto aerodigestivo superior se encuentra recubierta por cientos de pequeñas glándulas salivales menores. La función principal de las glándulas salivales es secretar a la saliva, que en primera instancia juega un papel significativo en la lubricación, digestión, inmunidad y mantenimiento general de la homeostasis del cuerpo humano. Juntos, los distintos tipos de glándulas salivales, producen en promedio la cantidad de mil a dos mil mililitros de saliva al día. En torno a los conductos excretores y a algunos acinos se encuentran células mioepiteliales, con núcleos y citoplasmas muy aplanados. Estas células ayudan a la expulsión del contenido glandular gracias a su capacidad contráctil. (3, 4)

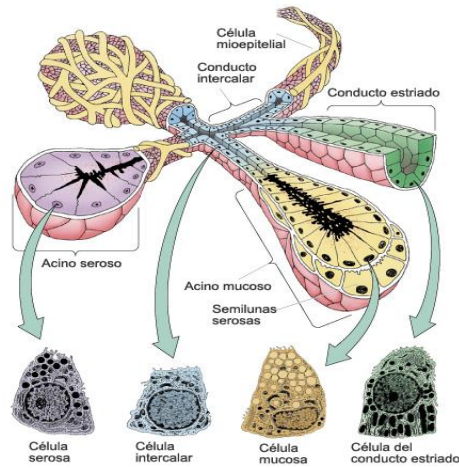


Figura 1 .Esquema y disposición de los tipos de células que conforman a las glándulas salivales

En la presente imagen se muestra la disposición espacial de las células que conforman el conducto intercalares de las glándulas mayores (célula intercalares y célula del conducto estriado) así como los distintos tipos de células que forman la porción secretoria de este sistema, entre las que encontramos a las células serosas y mucosas (5)

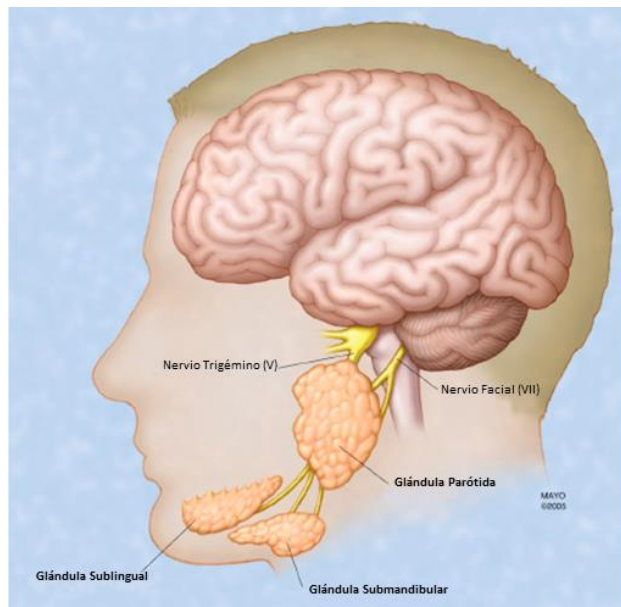


Figura 2. Localización anatómica de las glándulas salivales mayores

Imagen lateral de la cabeza donde se muestran a las glándulas salivales mayores que contribuyen en mayor medida a la producción de salival y al aporte del total de proteínas presentes en el biofluido. Siendo estas en pares, son las siguientes: las glándulas parótidas, localizada justo enfrente de la oreja y la de mayor tamaño de las tres; glándulas

submandibulares, ubicadas por debajo de la mandíbula y posterior a las sublinguales, que se ubican por debajo de la lengua. Imagen tomada de (6)

Además de iones y agua, la saliva contiene una compleja mezcla de cientos de proteínas derivadas de muchas fuentes. La mayoría de alta abundancia como amilasa, cistatinas y gustinas son sintetizadas y secretadas por las células acinares, mientras que otras, como las calicreínas y factores de crecimiento, son secretadas por las células ductales de las glándulas salivales. (3)

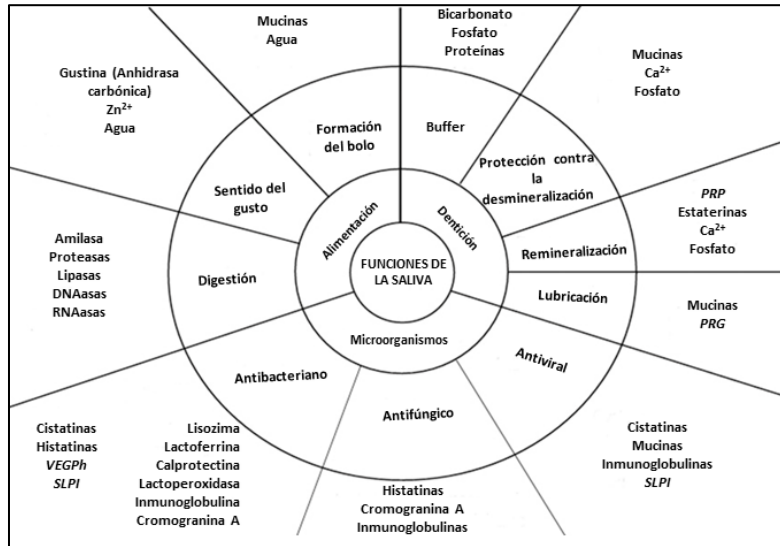


Figura 3. . Principales grupos de proteínas presentes en la saliva y funciones en relación a la homeostasis de la cavidad bucal

El estudio de estas proteínas que conforman el espectro principal de proteínas presentes en este biofluido ha sido enfocado en relación a funciones bucales; sin embargo, investigadores han encontrado evidencia de que su análisis podría servir para estudiar condiciones de carácter sistémico incluyendo cáncer, status psicológico, etc. (3)

Diagnósticos salivales. Un emergente campo de investigación.

Dada su riqueza en información molecular y su colección simple y no invasiva, la saliva tiene un tremendo potencial para transformar el campo de los diagnósticos en salud y enfermedad. Su composición molecular compleja es lo que le da su valor como fluido diagnóstico. Las alteraciones en la “firma” molecular de la saliva global, a diferencia de otros fluidos corporales, puede reflejar el estado fisiológico y patológico de los individuos, particularmente para condiciones que afecten a la cavidad bucal pero las evidencias sugieren que también en condiciones de localizaciones anatómicas distintas. (7)

El análisis de saliva, como los análisis basados en sangre, tienen dos propósitos: primero, identificar individuos con alguna enfermedad y segundo, seguir el progreso del individuo bajo tratamiento(8)

Los avances en el uso de saliva como fluido diagnóstico han tenido un tremendo impacto debido al desarrollo tecnológico actual. Por ejemplo, la capacidad de medir y monitorear un amplio rango de componentes moleculares en la saliva y compararlos con los componentes del suero ha hecho posible estudiar marcadores microbiológicos, químicos, inmunológicos, etc. Como consecuencia, estos avances tecnológicos han permitido mover a la saliva más allá de medir características de la salud bucal hacia donde pueda usarse para medir características esenciales de toda la salud(8) pues análisis proteómicos recientes han mostrado que la saliva global humana contiene potenciales biomarcadores que pueden contribuir a la detección de enfermedades tanto locales como sistémicas(9)

Yan y cols., realizaron una comparación sistemática (a través de análisis bioinformático usando *Gen Ontology*) de los proteomas salivales y plasmáticos concluyendo que ambos biofluidos muestran similitudes en la distribución sobre localización celular, procesos biológicos y función molecular.(10)

¿Por qué estudiar proteínas?

Griffin afirma que de los diferentes tipos de biomoléculas presentes en saliva, los productos proteicos tienen el mayor valor como medio diagnóstico pues estas llevan a cabo las funciones bioquímicas tanto dentro de las células como en los fluidos. De tal manera, que su detección en saliva global es reflejo de una “toma” de la actividad bioquímica que puede estar sujeta a estados fisiológicos o de enfermedad en el sujeto. Muchas veces estas actividades son reguladas por modificaciones postraduccionales (PTMS), lo cual no es reflejado por otras moléculas (DNA, RNA). Además, las proteínas pueden ser blancos estables para desarrollar ensayos sensitivos y específicos. (7)

En la salud humana, el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el análisis de la saliva no sólo mejorará la comprensión y diagnóstico de patologías bucales sino también la evaluación de estados sistémicos. Apoyado en conjunto por el *National Institute of Health* (NIH) y el *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR) el campo de diagnósticos salivales (*Salivary diagnostics*) ha recibido desde el año 2010 apoyos para realizar los estudios y desarrollar la tecnología necesaria para poder cristalizar la implementación de la saliva como medio diagnóstico y convertirlo en una realidad clínica.

Proteómica Salival

A través de la última década y media, la proteómica ha emergido como una ciencia multidisciplinaria enfocada en el análisis del proteoma – es decir, el complejo de proteínas expresadas en un sistema biológico en un momento determinado - así como sus estructuras, interacciones y modificaciones postraduccionales. En saliva, como se mencionó, la mayoría de proteínas se originan de las glándulas salivales. Sin embargo, la sangre, tejidos bucales y microorganismos, particularmente bacterias, pueden ser importantes fuentes de proteínas. Por lo tanto, todas las proteínas salivales tanto intrínsecas como extrínsecas, deben ser consideradas como parte del proteoma salival.(3, 4) El espectro de proteínas que conforman este proteoma

está dominado por algunos grupos particulares de proteínas ampliamente representados por sus isoformas, las cuales son evidentes al resolverse en un gel bidimensional (Figura 4).

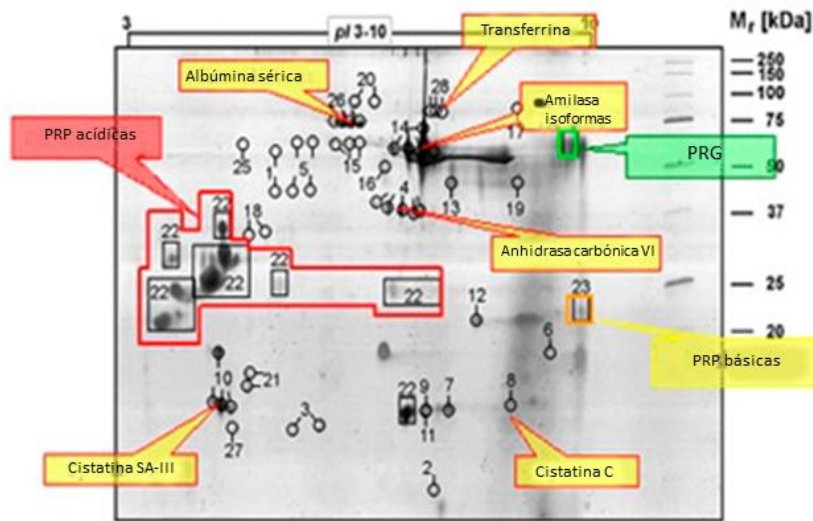


Figura 4. Principales grupos de proteínas salivales resueltos en un gel bidimensional

A través del uso de geles bidimensionales se han establecido mapas proteómicos representativos de muestras de saliva total donde se observa el dominio de grupos de proteínas que dominan el espectro de las proteínas presentes en este biofluido. (11)

Inicialmente, las plataformas proteómicas basadas en espectrometría de masas para llevar a cabo estos análisis, pueden ser clasificadas como proteómica ascendente (*top-down*) y proteómica descendente (*bottom-up*). La aproximación ascendente está basada en el análisis del proteoma intacto de manera natural, por lo tanto se pueden establecer diferencias tanto cualitativas como cuantitativas de las proteínas presentes en diferentes muestras y ser evaluadas para caracterizar probables biomarcadores específicos de la enfermedad. Las plataformas descendentes analizan la mezcla de fragmentos proteolíticos de un proteoma dado, conectando cada fragmento detectado a una proteína “pariente”. Todas las estrategias usadas para obtener perfiles proteómicos pueden ser incluidas con cualquiera de estas dos aproximaciones. Sin embargo, diferentes clasificaciones pueden ser propuestas, basadas en la preparación de la muestra, la estrategia de separación adoptada, y el espectrómetro de masas utilizado. En base a esto, las principales plataformas proteómicas incluyen (12):

**Shotgun proteomics*

*Plataformas basadas en geles bidimensionales

*Espectrometría de masas MALDI-TOF (o TOF/TOF) o plataformas basadas en SELDI

* Soluciones basadas en plataformas descendentes. Usualmente consisten en cromatografías líquidas mono o multidimensionales o separaciones por electroforesis capilar del proteoma de ocurrencia natural acoplado con diferentes opciones de MS.

Para analizar este complejo fluido orgánico y evaluar todo su complejo proteico, se han utilizado diferentes técnicas de separación e identificación que vienen incluidas en la clasificación previamente mencionada. Algunos autores como Castagnola han realizado revisiones exhaustivas acerca del tipo de estudio en que se han utilizado estas aproximaciones, mostrando que han sido empleadas tanto para caracterizar al proteoma salival como para descubrir biomarcadores en distintos tipos de enfermedades, asimismo hace énfasis en el hecho que la espectrometría de masas aún no es una tecnología completamente madura y ninguna aproximación en particular puede ser aún considerada como la panacea de descubrimiento de marcadores o caracterización de proteomas (12) (4) y aunque se puede considerar el proteoma salival humano esencialmente completo aún quedan varios retos por resolver que pueden ser abordados a través de combinación de diversas tecnologías proteómicas, puesto que es bien sabido la gran variabilidad y heterogeneidad de este fluido no sólo en lo que corresponden a su esqueleto peptídico sino a las diferentes modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación, acetilación, ubiquitinación, metilación, sulfatación y procesamiento proteolítico.(13)

Mucins: Mucinas
Carbonic anhydrase: Anhidrasa carbónica
Acidic PRPs: Proteínas ricas en prolina (ácidas)
Cystatins: Cistatinas
Statherins: Estaterinas
Basic PRPs: Proteínas ricas en prolina (Básicas)
Histatins: Histatinas
 α -amylases: alfa – amilasas
 α -defensins: alfa – defensinas
 β -thymosins: beta timosinas
IgG-IgM: Inmunoglobulinas G y M

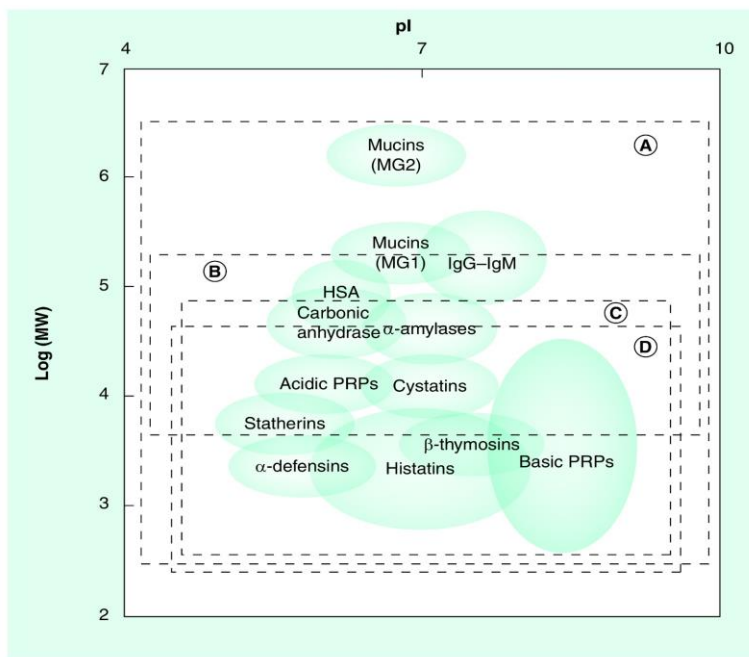


Figura 5. Simulación de un mapa 2D de muestra donde el rango del punto isoelectrico y el peso molecular de las clases más abundantes de proteínas salivales son reportadas como puntos.

Los cuadros (A-D) representan la capacidad aproximada de investigar el proteoma con A) *Shotgun proteomics* B) Plataformas basadas en geles bidimensionales; C) Plataformas basadas solamente en MALDI y SELDI D) Plataformas top-down Cromatografía líquida – MS. Excepto por *shotgun proteomics*, las otras plataformas tienen una limitada e incompletos rangos de solapamiento. HSA: Albúmina de suero humano; MW: Peso molecular; pI: punto isoelectrico; PRP: Proteínas ricas en prolina. (12)

Autores como Ruhl y Siqueira afirman que sería más revelador el estudio de estos subproteomas para encontrar potenciales indicadores de condiciones fisiológicas, siendo uno de los más atractivos el glicoproteoma salival, ya que es la modificación postraducciona l más común en respuesta a condiciones tanto locales como sistémicas por lo que representa un campo fértil de investigación (13, 14)

Bases de Datos de Proteoma y proteínas salivales.

Hasta el momento en el que se escribe este documento y de acuerdo a nuestro conocimiento, las únicas dos bases de datos disponibles en particular para proteínas salivales son: la creada a partir del Proyecto del Proteoma Salival Humano (HSPP) realizado por un consorcio de varias universidades de Estados Unidos (UCLA, Universidad de Rochester, Universidad de Minnesota, Scrips Research Institute) (Salivaomics Knowledge Base, UCLA. Dirección: <http://www.hspp.ucla.edu/>) y la base de Datos realizada por el grupo de investigación del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Portuguesa, encabezado por Rosa Nuno(15), (Oral Card–Web Information System for Oral Health Dirección: <http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) la cual no se conformó en base a estudios experimentales realizados por el grupo, sino a una curación, clasificación e integración mediante herramientas bioinformáticas (“IPI History search”, Unit Prot, PANTHER y DAVID)de las proteínas reportadas como potenciales biomarcadores en saliva a partir de una revisión exhaustiva de la literatura.

Orígenes y presencia en saliva de biomarcadores para enfermedades distantes de cavidad bucal, en particular cánceres.

Sobre la presencia en saliva de moléculas de origen distante existen diferentes teorías y evidencias, algunas son de reciente puesta en escena y por lo tanto, sólo han sido parcialmente demostradas. Actualmente se llevan a cabo investigaciones que arrojen luz sobre estas interrogantes cruciales para la aceptación de saliva como un medio diagnóstico para enfermedades sistémicas. A continuación se hará breve mención de las diferentes posturas respecto al tema:

Biomoléculas que viajan a través del torrente sanguíneo y que representan potenciales biomarcadores eventualmente alcanzan destinos tan distantes como las glándulas salivales, el cual es un tejido permeable y recubierto por capilares. Se postula que las moléculas podrían pasar a estos tejidos vía transcelular (transportes pasivos y activos) o utilizando rutas paracelulares (ultrafiltración extracelular) difundiendo a través de los complejos acinares y mezclándose con las secreciones salivales. Asimismo, dado que toda la cavidad bucal es un lugar altamente

vascularizado, las moléculas pueden ser transportadas a través de las mucosas fácilmente hacia la cavidad bucal y viceversa.(16) (Figura 6, lado A). El fluido crevicular gingival es otra posible vía sistémica de llegada a la saliva total, pues experimentos pioneros demostraron que al inyectar tinciones sistémicamente a ratones, estas podían ser detectada en este biofluido, dejando claro que es un trasudado directo del suero, sin embargo, también presenta constituyentes de células y tejidos del periodonto que delimitan el crévice gingival (17) (Figura 6, lado B).

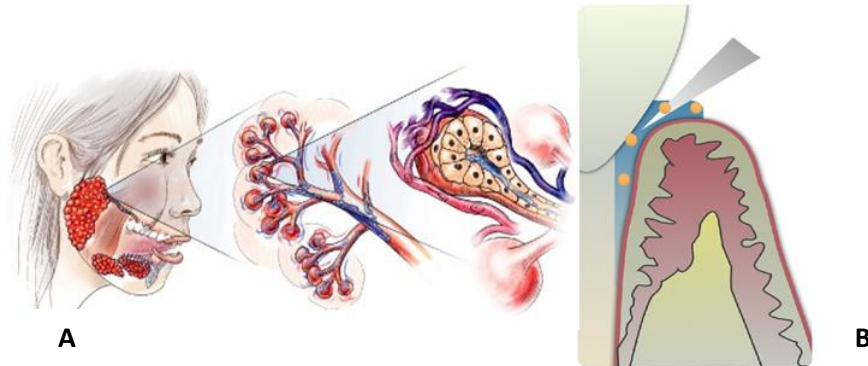


Figura 6. Diversos mecanismos de transporte de moléculas hacia la saliva.

Posible llegada vía circulación sistémica de diversas moléculas que pueden regular a su vez la expresión de otras moléculas expresadas por las glándulas salivales. A) Se muestra la proximidad de las glándulas salivales al sistema vascular, enfatizando que es un sistema altamente vascularizado que permite el intercambio de constituyentes sanguíneo. Las alteraciones en la composición molecular sanguínea puede modificar subsecuentemente la composición de las secreciones salivales. Este es el raciocinio por el cual se piensa es posible hallar biomarcadores para enfermedades sistémicas a través de la saliva. B) El fluido crevicular gingival que tiene una comunicación más directa con el suero, podría ser uno de los principales contribuyentes a la presencia de moléculas (en amarillo) de origen sistémico en la denominada saliva total una vez que entra a la cavidad bucal y se combina con el fluido de origen glandular. (Imagen de la izquierda: Tomada de internet, Imagen de la derecha tomada de: (18))

Streckfus y colaboradores postulan (19) –haciendo énfasis en su modelo de cáncer de mama-biomarcador *c-erb-2* en saliva- que al igual que en células de localización paracrina a las células tumorales, existe una comunicación célula- célula entre las células tumorales y las células glandulares salivales resultado de la sobreexpresión y eventual secreción de proteínas por parte de las células neoplásicas, lo que da como resultado una respuesta humoral a través de vías de señalización que conducen que la célula receptora (glandular salival) secrete mayor cantidad de esta (*c-erb-2*) y otras moléculas más. (Ver Figura 7, lado B).

En consonancia con la hipótesis anterior, *Gao* y colaboradores utilizaron (20) modelos murinos de melanoma y cáncer pulmonar para demostrar la existencia de cambio en la expresión transcripcional de las glándulas salivales (tejido y saliva) en ratones con tumores inducidos distantes de cavidad bucal comparados con grupo control, concluyendo que factores de transcripción de origen distante a las glándulas salivales pueden llegar a estas y alterar los niveles de expresión génica teniendo como consecuencia cambios en las moléculas secretadas por parte de las glándulas salivales. (Ver Figura 7, lado A)

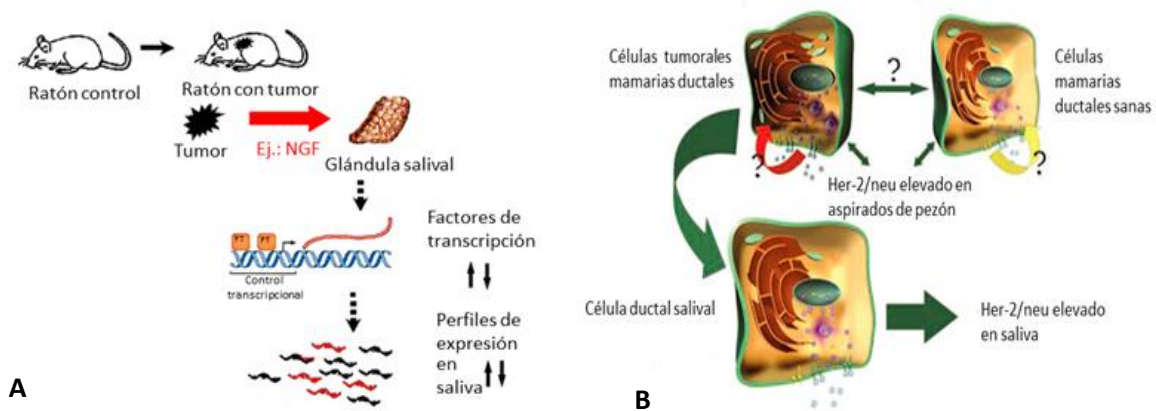


Figura 7. Posible origen y presencia en saliva de biomarcadores para tumores distantes de cavidad bucal.

Hipótesis y evidencias emergentes sobre la presencia de biomarcadores distantes de cavidad bucal en saliva, en particular, biomarcadores para cáncer. A) Usando un modelo murino de melanoma se postula la relación entre cambios en los perfiles transcripcionales (mRNA) de las glándulas salivales vía comunicación con tumores distantes, estableciendo que mediadores como NGF (factor de crecimiento nervioso) secretados por las neoplasias se trasladan vía sanguínea hasta las glándulas salivales y estimulan la expresión de factores de transcripción (FT) alterando por lo tanto el perfil de mensajeros salivales. B) De manera similar, en el caso de cáncer de mama se postula la sobreexpresión de proteínas (ligandos) como *c-erb-2*, resultado del crecimiento tumoral puede estimular a células cercanas pero también pueden viajar sistémicamente y llegar hasta órganos distantes como las glándulas salivales, donde se acoplan a receptores, esto hace que se activen cascadas de señalización y da como resultado *loop* endocrino que conduce que ahora las células acinares de las glándulas salivales expresen y secreten elevadas concentraciones de *c-erb-2*. Los signos de interrogación representan proteínas desconocidas, pero que podrían estar participando de forma integral en estas comunicaciones célula-célula. (Imágenes tomadas de los artículos correspondientes).

En estos últimos años, se ha propuesto que los exosomas (microvescículas de 30-100 nm de diámetro de origen endocítico) son probablemente los transportadores, hacia la saliva, de biomarcadores sistémicos o que quizás son los transportadores de efectores sobre la maquinaria transcripcional de las glándulas salivales, pues estudios han mostrado como estos exosomas pueden ser liberados por una célula y captados por otra e influir en las firmas moleculares de la célula receptora. En su interior contienen proteínas, distintos tipos de RNA e incluso DNA y han sido identificados en la mayoría de los biofluidos incluida la saliva. (21) Se ha demostrado a través de marcajes con proteína verde fluorescente en líneas celulares tumorales de cáncer de pulmón (H460) implantandos en ratones que estos exosomas son liberados y subsecuentemente pueden ser hallados en suero así como en saliva. (22)

Otras posibles fuentes de aporte para biomarcadores presentes en saliva son bacterias, descargas de origen nasofaríngeo, células epiteliales bucales, etc., dado que todas estas contribuyen a la denominada saliva global. Autores afirman que la mayoría de biomarcadores identificados hasta este momento no pertenecen a componentes intrínsecos de las glándulas

salivales, sino que son derivados del suero que pasaron a la saliva por los mecanismos de difusión descritos. Contrario a esta opinión otros autores mencionan que la tasa de flujo y composición de la saliva total esta abrumadoramente representado por las secreciones de las glándulas salivales mayores, lo que sugeriría que este es el origen principal de biomarcadores, todo esto pone en relevancia que todas las fuentes mencionadas pueden contribuir al espectro de moléculas presentes en la saliva y por lo tanto siempre deben tenerse en mente (3, 13, 21). Estos conceptos dejan claro que el tema del origen de los biomarcadores salivales para enfermedades es de amplio debate, pero las diferentes teorías e hipótesis no son excluyentes unas de otras lo que puede establecer que distintos de estos mecanismos ocurran al mismo tiempo existiendo múltiples vías de contribución a la presencia de moléculas y analitos presentes en saliva que sean excelentes candidatos para fines diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

ANTECEDENTES DE CÁNCER PULMONAR

A partir del siglo 20, la población mundial comenzó a experimentar un incremento en la mortalidad por cáncer de pulmón debido a la exposición crónica al humo de tabaco. (23)

El cáncer de pulmón (CP) es una enfermedad heterogénea y agresiva. A pesar de los avances en cuanto a tratamientos las tasas de sobrevivencia a largo plazo aún permanecen bajas. En Estados Unidos se calcula que 94 millones de personas fumadoras se encuentran en riesgo de desarrollar esta enfermedad, lo cual la hace permanecer como la principal causa de muerte por cáncer en este país. (1)

La incidencia de cáncer pulmonar es relativamente baja antes de los 50 años, pero se observa un incremento posterior a esta edad, en especial, después de los 60 años. Del año 2005 al 2009 las tasas de incidencia global -ajustada por edad- por cada 100,000 habitantes fueron mayores en hombres que en mujeres (76.4 vs 52.7), y mientras que las tasas de incidencia específicas por edad son similares en ambos sexos antes de los 50 años, con el incremento de esta se observa un aumento en la diferencia de las tasas específicas por edad. Tanto la magnitud de edad ajustada como las tasas específicas de edad tienen influencia de la prevalencia subyacente de diversos factores de riesgo para cáncer pulmonar, de los que, la exposición previa a humo de tabaco tiene la mayor.(23)

El CP es la primera causa de muerte por cáncer en México. Para 2008, las muertes por CP en el país fueron 6,697, las cuales exceden a las producidas por otros tumores (estómago, próstata, mama e hígado). Se reconoce que existen dificultades para realizar análisis de datos epidemiológicos de CP en México ya que existe una ausencia en registros de cáncer a nivel hospitalario y poblacional; de igual manera, en protocolos que permitan determinar si el tumor es primario o metastásico. En el país, se ha observado un aumento en la incidencia a partir de 1970, particularmente durante 1994 a 2004, periodo en el que se registraron 397,400 muertes por neoplasias malignas; de éstas, 45,578 (11.5%) correspondieron a cáncer pulmonar y se estima que la incidencia se incrementó en un 16%. (24)

Factores de Riesgo para cáncer pulmonar

De manera general, los principales factores de riesgo, por orden de importancia, son el tabaquismo activo y pasivo (Algunos autores estiman que constituye probablemente el 85% de los casos) y la exposición a humo de leña. En México, 16% de las personas mayores de 15 años son fumadoras (11 millones de habitantes) y 16.4 millones de habitantes están expuestos a humo de leña. La exposición al humo de leña por más de 50 años se ha relacionado con CP en mujeres mexicanas no fumadoras, afectadas en particular por CP de tipo adenocarcinoma. Otros factores de riesgo incluyen la exposición a elementos como arsénico, sílice, asbesto, uranio, radiación ácido

crómico, éter, clorometilo, níquel e hidrocarburos policíclicos aromáticos; así como factores genéticos (agregación familiar) dieta (vitamina A, E, colesterol) y la contaminación ambiental. Actualmente, también se considera que la tuberculosis pulmonar puede aumentar el riesgo de CP hasta 11 veces, en particular las de tipo histológico adenocarcinoma. Aunque se ha mostrado evidencia acerca del tipo de alteraciones moleculares generadas por la mayoría de estos, es reconocido que aún existe una falta del conocimiento acerca de cuáles son los mecanismos y vías subyacentes presentes. (24) (25)

A pesar de la demostración de la amplia asociación tabaquismo – desarrollo de cáncer pulmonar para un porcentaje mayoritario de casos a nivel mundial, Franco-Marina y colaboradores en un estudio (26) de casos y controles realizado en la ciudad de México concluyeron que el tabaquismo pasivo y activo explica apenas un tercio del total de los casos analizados y ponen en relevancia la necesidad de estudiar otras probables causas asociadas en la población mexicana, como el hecho de que previamente han existido hallazgos de altas concentración de radón en hogares mexicanos, producto químico también asociado a la enfermedad.

Clasificación del cáncer pulmonar, estadificación, tratamiento y pronóstico

El diagnóstico inicial depende generalmente de la evaluación clínica de síntomas como tos crónica, voz ronca, pérdida de peso, disnea, hemoptisis y dolor en pecho, síntomas inespecíficos que pueden retrasar el diagnóstico. Clínica e histológicamente el cáncer de pulmón puede ser dividido en 2 categorías principales: Cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) mismos que requieren distintos manejos y regímenes de tratamientos. (27)

El CPCP comprende el 20 – 25% de los cánceres de pulmón. Se caracteriza por una progresión más rápida pero es relativamente sensible a la quimioterapia y radioterapia aunque generalmente ha metastatizado al momento del diagnóstico. El tratamiento consiste por lo general en quimioterapia y radiación torácica concomitante, pero esto es dependiente del estadio. El CPCP a menudo muestra evidencia de diferenciación neuroendocrina tanto a estructural como inmunohistoquímicamente. (27)

El CPCNP comprende entre el 75 al 80% de todos los cánceres pulmonares, es el grupo morfológicamente más diverso e incluye al carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar de células grandes y adenocarcinoma (Figura 8). El carcinoma de células escamosas tiene localización central en las vías aéreas grandes y se encuentra caracterizado por una extensiva queratinización y por uniones intercelulares dadas a través de desmosomas. Los adenocarcinomas, son un tipo de tumor caracterizado por la producción de mucina, que surge periféricamente en las vías aéreas pequeñas. En CPCNP el abordaje terapéutico está centrado alrededor de la cirugía debido a que la metástasis ocurre tardíamente en este tipo de tumor. Para pacientes que manifiestan la etapa más temprana de la enfermedad al momento del diagnóstico, la tasa de curación a 5 años es de aproximadamente el 50%. (27) (Tabla 2).

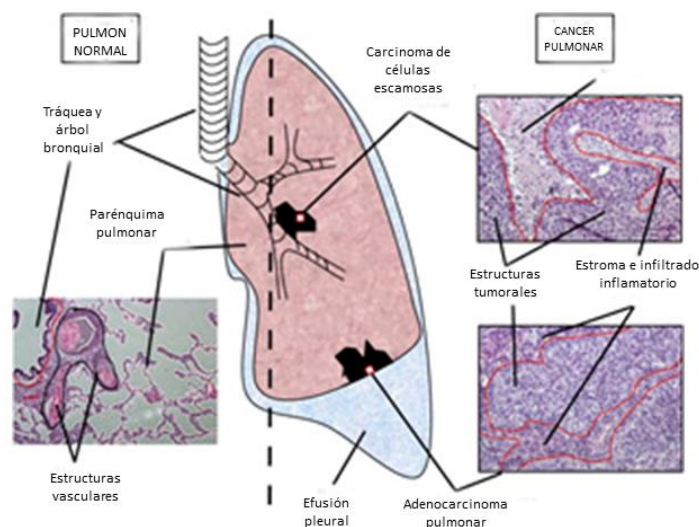


Figura 8. Características histopatológicas diferenciales entre un pulmón normal y pulmón con cáncer pulmonar de células no pequeñas (Carcinoma de células escamosas y Adenocarcinoma).

Los cánceres de pulmón frecuentemente presentan heterogeneidad histológica, con variaciones en apariencia y diferenciación de campo a campo microscópico y de una sección histológica a la otra. El carcinoma de células escamosas (parte superior derecha) es un tumor epitelial maligno que muestra queratinización y/o puentes intracelulares que surgen del epitelio bronquial. Por su parte, los adenocarcinomas (parte inferior derecha) se definen como tumores epiteliales malignos con diferenciación glandular o producción de mucina, que muestran patrones de crecimiento acinar, papilar, bronquioalveolar, sólido o una mezcla de estos patrones, junto con la producción de mucina.(28)

Estadificación

Las estrategias terapéuticas están estrechamente relacionadas con la estadificación del tumor, pues se mide la extensión del tumor y esto permite una agrupación racional de pacientes con una enfermedad similar de cara al pronóstico y con propósitos terapéuticos. En fase prequirúrgica se define que pacientes pueden beneficiarse de la resección pulmonar y ayuda a la selección de sujetos para programas de terapias de inducción, etc. El sistema de estadificación está basado en criterios aceptados por la *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* de la clasificación TNM y se aplica principalmente a CPCNP. Este sistema está basado en la determinación del tamaño, localización y extensión del primario (T), presencia y situación de metástasis ganglionares (N) y presencia o ausencia de metástasis a distancia (Tabla 1). De manera general, se considera pacientes con tumor resecable aquellos en estadio clínico I, II y algunos con estadio IIIA; la mayoría de pacientes con estadio IIIB y IV se tratan con radioterapia, quimioterapia o de manera combinada.(29)

Tabla 1. Clasificación TNM

Tumor primario (T)

T0: Sin evidencia de tumor primario

TX: El tumor no puede determinarse o no es identificable radiológica o broncoscópicamente (células malignas en el esputo)

Tis: carcinoma *in situ*

T1: El tumor presenta algunas de las siguientes características:

- a. Tamaño \leq 3 cm
- b. Localización en la vía aérea: en el bronquio lobar o vía aérea distal
- c. Invasión local: ninguna, rodeado de pulmón o de la pleura visceral

T2: el tumor presenta algunas de las siguientes características:

- a. Tamaño > 3 cm
- b. Localización en la vía aérea: afectación del bronquio principal (distal a la carina a 2 cm o más) o presencia de atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, pero que no afecta a todo el pulmón.
- c. Invasión local: afectación de la pleura visceral.

T3: el tumor presenta algunas de las siguientes localizaciones o invasión:

- a. Tamaño: cualquiera
- b. Localización en la vía aérea: tumor en el bronquio principal (a menos de 2 cm de la carina), o tumor con atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón
- c. Invasión local: Invasión de la pared torácica (incluyendo el tumor del sulcus superior), diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal.

T4: el tumor presenta alguna de las siguientes localizaciones o invasión:

- a. Tamaño: cualquiera
- b. Localización en la vía aérea: nódulo o nódulos satélites al tumor en el lóbulo del tumor primario.
- c. Invasión local: invasión del mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral o carina; o presencia de derrame pleural o pericárdico maligno.

Adenopatías (N)

Nx: No puede determinarse la presencia de adenopatías regionales.

N0: Ausencia de adenopatías regionales afectas.

N1: Presencia de metástasis en adenopatías homolaterales peribronquiales y/o adenopatías hilares (incluyendo la extensión directa a adenopatías intrapulmonares).

N2: Presencia de metástasis a adenopatías mediastínicas y/o subcarinales

N3: Presencia de metástasis a cualquiera de los siguientes grupos ganglionares: mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalenos homo o contralaterales o supraclaviculares

Metástasis a distancia (M)

Mx: No puede determinarse la presencia de metástasis

M0: Ausencia de metástasis a distancia

M1: Presencia de metástasis a distancia (nódulos o nódulos metastásicos separados del tumor en un lóbulo distinto del tumor primitivo aunque sea en el tumor homolateral se considera M1)

ESTADIOS-TNM

Estadio 0 (TisN0M0)

Estadio IA (T1N0M0)

Estadio IB (T2N0M0)

Estadio IIA (T1N1M0)

Estadio IIB (T2N1M0, T3N0M0)

Estadio IIIB (T4, cualquier N, M0) (cualquier T, N3M0)

Estadio IV (cualquier T, cualquier N, M1)

Tabla 1. (Continuación)**Estudios de tamizaje para cáncer de pulmón**

Durante las décadas de los años 1970's y 1980's se buscó determinar si al realizar tamizajes utilizando radiografías de tórax ya sea sola o en conjunto con citología de esputo existía reducción en la mortalidad de CP. Se llevaron a cabo cuatro ensayos clínicos prospectivos aleatorizados, de los cuales, ninguno demostró una reducción significativa en la mortalidad, sin embargo, estos resultados fueron polémicos debido a errores metodológicos, ya que otros estudios mostraban que realizando radiografía de tórax ya sea sola o en combinación con citología de esputo mejoraba la etapa de diagnóstico y estaba asociada con una sobrevida favorable. Sin embargo, siempre fue aceptado de manera general que el tamizaje de CP mediante radiografías no era una medida efectiva y fue eliminado como recomendación general alrededor de 1980.(23)

Tabla 2. Recomendaciones generales de tratamiento para CPCNP de acuerdo al estadio (30)

Estadio	Est % ^a	Recomendaciones generales de tratamiento	Sobrevida a 5 años ^b	
			Estadio clínico	Estadio patológico
IA	14%	Resección quirúrgica	50%	73%
IB	10%	Resección quirúrgica, puede considerarse quimioterapia adyuvante en casos selectos (ej. tamaño tumoral >4 cm)	43%	58%
IIA	6%	Resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante	36%	46%
IIB	5%	Resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante	25%	36%
IIIA	16%	Tratamiento multimodalidad: Quimioterapia, radiación, +/- cirugía	19%	24%
IIIB	8%	Tratamiento multimodalidad: Quimioterapia y radiación	7%	9%
IV	41%	Quimioterapia, terapias blanco consideradas de acuerdo a mutaciones <i>driver</i>	2%	N/A

a Estimado a partir del set de validación de la SEER de la propuesta hecha en la 7ª Edición *IASLC staging*.

b La sobrevida global es más alta por estadio patológico debido al estadio clínico, que es estimado por las características clínicas basadas en CT escáner, PET, etc.

En noviembre del 2010 el NCI (*National Cancer Institute*) anunció que la evaluación del *National Lung Screening Trial* (NLST) mostraba una reducción estadísticamente significativa del 20% en la mortalidad de cáncer pulmonar en un grupo de adultos en alto riesgo de padecer la enfermedad que fueron aleatorizados para recibir 3 exámenes anuales consecutivos para detectar CP (en un primer punto de referencia, al año 1 y al año 2 con tomografía computada de baja dosis (LDCT)) comparada con un grupo de riesgo equivalente de adultos aleatorizados que recibieron 3 radiografías de pecho anuales consecutivas. (23) Al ser un estudio con una gran población de estudio fue muy estricto en cuanto al apego a los criterios de elegibilidad, parte fundamental de su éxito. Esto ha conducido que algunas organizaciones recomienden actualmente adoptar el tamizaje de cáncer pulmón como parte de la práctica clínica en personas que se encuentren en alto riesgo, esto, si se encuentran disponibles medios imagenológicos de alta calidad, métodos diagnóstico y tratamientos disponibles. La mayoría de estas recomendaciones identifican a personas para ser evaluadas aplicando el criterio de NLST, que incluye una edad entre 55 y 74 años, historia de consumo de tabaco de al menos 30 paquetes año, y período de no más de 15 años desde que se haya cesado el consumo, incluyendo ligeras variantes de estos criterios. Estos criterios de selección fueron establecidos para intentar incrementar la eficiencia de diagnosticar CP.(31)

Sin embargo, autores como Okamura (32) mencionan que a pesar de la alta sensibilidad obtenida en este estudio, la especificidad por su parte fue muy baja, por lo que pone en relevancia la necesidad de buscar formas de diagnóstico que se utilicen en conjunto o independientemente de un estudio CT. A su vez, Tammemagi afirma que en el estudio excluyen muchos factores de riesgo conocidos para CP, y que con la dicotomización de datos continuos mucha información valiosa no es incluida, por lo que proponen y validan un modelo que resulta ser más sensitivo comparado con los criterios del NLST para la detección de cáncer. Este modelo incluye datos sobre enfermedad pulmonar obstructiva crónica, intensidad de fumador, duración del acto de fumar, índice de masa corporal, y además se incluyen a sujetos nunca fumadores que fueron diagnosticados con CP, entre otras variables más.(31)

Bases moleculares del cáncer de pulmón

La patogénesis del cáncer pulmonar y de muchos otros tipos de tumores malignos involucra la acumulación de múltiples anomalías moleculares a través de un largo periodo de tiempo, donde la inestabilidad genómica es universalmente ubicua durante la acumulación de estos *hits*. (25)

Nivel cromosómico

A nivel cromosómico las células cancerosas frecuentemente segregan de manera incorrecta sus cromosomas durante la mitosis. Este fenómeno, conocido como inestabilidad cromosómica global (W-CIN por sus siglas en inglés) conduce a la aneuploidia, que es una característica de la mayoría de los tumores sólidos. Las células tumorales adquieren esta *W-CIN* a través de tres principales mecanismos: Defectos en los puntos de control mitóticos, sobreduplicación del centrosoma o falla de cohesión entre cromátidas hermanas.(33)

Usualmente los carcinomas pulmonares son altamente aneusómicos con ganancias o pérdidas de grandes regiones o cromosomas completos. Estos tumores también exhiben reordenamientos estructurales simples y complejos responsables de alteraciones en expresión transcripcional y de proteínas. Se incluyen variaciones génicas en el número de copias debido a deleciones, duplicaciones o amplificaciones y fusiones génicas conducidas por inserciones, inversiones y traslocaciones.(34)

La primera anomalía cromosómica recurrente reconocida en CP fue la deleción de 3p. También se han identificado amplicones focales de gran amplitud que involucran a miembros de la familia MYC (*MYCL1*, *MYCN* y *MYC*), participantes en las vías de EGFR (*EGFR*, *PIK3CA*, *KRAS*) y otros genes que controlan la proliferación celular como *FGFR1*, *TP63*, *TERT*, *CCDN1*, *CCNE1* y *NKX2-1*.(34)

Entre los primeros eventos en el desarrollo de CPCNP se incluye pérdida de heterocigidad (*LOH*, por sus siglas en inglés) en la región cromosómica 3p21.3 (sitio de *RASSF1A* y *FUS1*) 3p14.2 (*FHIT*) 9p21 (p16), 5p y 17p13 (p53). Se sabe que los patrones de *LOH* entre adenocarcinoma pulmonar y carcinoma pulmonar de células escamosas difiere (Las deleciones en el cromosoma 3p son más extensas en el de células escamosas(25, 28), así como también este tipo de tumor se han mostrado regiones amplificadas comunes en los brazos de cromosomas 1q, 3q, 5p, 8q, 11q, 12p, 17q y 20q Se ha demostrado que aparte de sufrir mutaciones puntuales y *LOH* en 9p21 también puede ocurrir hipometilación del gen y esto provee de mecanismos alternativos de inactivación en un 15-30% de los casos de CPCNP.(25)

Nivel génico

Estudios epidemiológicos han mostrado asociación entre historia familiar y el incremento del riesgo de padecer CP lo que da evidencia acerca de la susceptibilidad del huésped. Se ha observado susceptibilidad a cáncer pulmonar por mutaciones raras de p53, RB y EGFR en la línea germinal. El riesgo y susceptibilidad también se ha visto incrementado con la reducción de la capacidad de reparación del DNA resultado de alteraciones de la línea germinal en genes reparadores del DNA como por ejemplo *ERCC1*.(28)

En los eventos tempranos de oncogénesis pulmonar se han identificados mutaciones que involucran tanto a genes supresores de tumores como a proto-oncogenes y sus productos de activación. (25)

KRAS

El gen de RAS codifica a una familia de proteínas unidas a membrana de 21 kDa y de unión a guanosina trifosfato (GTP) que regulan el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis interaccionando con múltiples efectores. En 1984 se demostró especímenes de cáncer pulmonar contenían una mutación activadora de *KRAS* que no se encontraba en su contraparte tisular normal.(35, 36)

Hoy en día se sabe que las proteínas RAS adquieren un potencial transformante cuando un aminoácido en la posición 12, 13 o 61 es remplazado, resultando en una mutación puntual del gen.

Las mutaciones en KRAS son las mutaciones más comúnmente reportada en adenocarcinoma, constituyendo un 30% de los casos, siendo menos frecuente en otros subtipos.(25, 35)

La activación de KRAS aparece como un evento temprano que precede a la enfermedad relacionada a fumar y se encuentra limitada a CPCNP predominantemente del subtipo adenocarcinoma y asociada a resistencia a inhibidores de EGFR y quimioterapia.(28)

En presencia de Kras activado se ha observado que como mutación adicional ocurre inactivación de p53, Lkb1, Ink4a/Arf, Rb y PTEN.(36)

EGFR

Se han identificado mutaciones somáticas activadoras de EGFR en 23% de adenocarcinoma pulmonares. Mutaciones L858R representan entre el 30-45% de todas las mutaciones de EGFR y las deleciones del exón 19 representan entre el 45-50% de todas las mutaciones de EGFR en adenocarcinoma.(36)

Como mutación secundaria se ha identificado que T790M es adquirida en el 50% de los tumores resistentes a erlotinib, por lo que se han utilizado modelos murinos construidos mediante ingeniería genética para evaluar estrategias terapéuticas.(36)

EGFR es un regulador de importantes procesos tumorigénicos y frecuentemente se encuentra sobreexpresado en el desarrollo y progresión del CPCNP. La vía Ras-Raf-Mek que se encuentra involucrada en la señalización secuencia abajo en EGFR conduce al crecimiento de las células cancerosas y a la progresión tumoral. Diversos ensayos clínicos han validado en EGFR como una molécula blanco para terapia contra el cáncer. Como medicamento para el tratamiento de segunda y tercera línea de este tipo de CP se ha utilizado a erlotinib; y por su parte, al medicamento monoclonal cetuximab (combinado con quimioterapia) para el tratamiento de la enfermedad en etapa avanzada. Sin embargo, la gran mayoría de pacientes con respuesta inicial a erlotinib y gefitinib eventualmente sufren recaídas.(28)

EML4-ALK

El gen de fusión transformante EML4-ALK fue reportado por primera vez en CPCNP en el año de 2007. Estos tumores malignos contienen células con una configuración anormal del DNA, donde el gen EML4 se fusiona con el gen de ALK. Esta fusión génica conduce a la producción de una proteína que promueve y mantiene en muchos casos el comportamiento maligno de los tumores pulmonares. Estos rearrreglos somáticos de ALK se han identificado en el 6% de adenocarcinomas pulmonares y se han utilizados modelos murinos construidos mediante ingeniería genética para evaluar estrategias terapéuticas. (36, 37)

P53

Los principales genes supresores de tumores involucrados en CP son TP53, RB1 y CDKN2. TP53 es bien conocido por su papel clave en la regulación negativa de la transición en la fase G1/S del ciclo

celular y por ser un guardián en el proceso de apoptosis. Las mutaciones y sobreexpresiones de TP53 son universales en CP y se asocian con tabaquismo y tumores más agresivos. (34)

Estadísticamente las mutaciones en p-53 son más comunes en carcinoma de células escamosas y carcinoma de células pequeñas del pulmón y se estima que junto con mutaciones en RB constituyen en más del 90% de este tipo de tumores. Sin embargo, como mutación somática inactivadora adicional se ha identificado en un 10-35% de adenocarcinoma pulmonares. (36)

OTROS

LKB1 se encuentra frecuentemente mutado en los tumores de CPCNP y se piensa que su función es como gen supresor de tumores a través de interacciones con p53 y CDC42 modulando la actividad de AMPK. Su función se ha implicado en tumorigénesis temprana, subsecuente diferenciación y el desarrollo de metástasis.(28)

La amplificación de TTF1 en la región 14q13.3 es el evento focal más común en adenocarcinoma pulmonar. Este gen codifica a un factor de transcripción específico de linaje y se ha hipotetizado que participa cooperativamente con otros genes en la patogénesis de CP.(28)

Los niveles de VEGF en células epiteliales bronquiales de fumadores se incrementan en asociación con la progresión de displasia bronquial de bajo grado a alto y sus niveles circulantes pueden predecir el beneficio clínico de los inhibidores de la expresión de esta biomolécula en pacientes con la enfermedad por lo que ha aprobado el uso del anticuerpo monoclonal bevacizumab en combinación con quimioterapia para CPCNP avanzado, asimismo se han realizado ensayos clínicos para validar su uso en combinación con erlotinib o vandetanib, inhibidor del receptor EGFR.(28)

En lesiones pulmonares premalignas se han reportado la metilación común de los genes p16 y FHIT y MGMT, DAPK y RASSF1A. La metilación de p16 durante el desarrollo de adenocarcinoma ocurre raramente, y solo tardíamente en precursores. Algunos marcadores de metilación en esputo están asociados con el riesgo de CP (p16 metilado) y con la recurrencia de la enfermedad (ASC-TMS1/PYCARD). (28)

Se ha hipotetizado que las células precursoras de adenocarcinoma pulmonar son células troncales broncoalveolares donde las vías de señalización KRAS, Pten, PI3K y cinasa dependiente de ciclina están implicadas en la proliferación de estas células malignas.(28)

La vía de señalización PI3K-Akt-mTOR que también está asociada secuencia abajo con EGFR se encuentra activada en eventos tempranos de la carcinogénesis de CP. mTOR es blanco del medicamento rampamicina; por su parte la inhibición de akt puede inducir apoptosis en células pulmonares malignas y premalignas y prevenir la carcinogénesis en modelos animales. (28)

Perfiles y biomarcadores moleculares en cáncer

Los perfiles moleculares, incluyendo los perfiles para genes y proteínas tienen el potencial de mejorar los resultados clínicos en pacientes con CP, sin embargo existen grandes obstáculos en el desarrollo de marcadores efectivos pues existe una alta heterogeneidad tumoral y compleja interrelación entre el medio ambiente y el huésped así como una complejidad, multiplicidad y redundancia en las redes de señalización de las células tumorales que involucran efectos genéticos, epigenéticos y microambientales. Hay una emergencia en el desarrollo de técnicas para evaluar globalmente el DNA genómico, el RNA mensajero, los microRNAs, los patrones de metilación y las redes de señalización de proteínas y fosfoproteínas, esto puede ayudar a sobrepasar estos obstáculos. (28)

Un **biomarcador** se define como una característica objetivamente medible y evaluada como indicador de un proceso biológico normal, patogénico, o producto de la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. En cáncer, un biomarcador se refiere a una sustancia o proceso indicativo de la presencia cancerosa en el cuerpo. El biomarcador puede ser o una molécula expresada, secretada por la célula tumoral o puede ser una respuesta específica del cuerpo a la presencia del cáncer.

Se han investigado potenciales biomarcadores genéticos, epigenéticos, proteómicos, glicómicos, de imagen, entre otros, para ser utilizados como medio diagnóstico, pronóstico y epidemiológicos. Estos marcadores pueden ser evaluados a través de biofluidos colectados de forma no invasiva o mínimamente invasivos, sin embargo, hasta el momento pocos biomarcadores son altamente sensibles y específicos para la detección del cáncer.

Los marcadores moleculares en CP pueden significar riesgo (en gente sin cáncer), pronóstico (resultado independiente del tratamiento), y sensibilidad al tratamiento a través de marcadores predictivos. Tales marcadores específicos de estadio pueden abarcar el curso de la enfermedad desde etapas tempranas hasta etapas tardías. Asimismo, pueden ayudar a definir mecanismos de resistencia a la terapia.(28)

Clasificación de los biomarcadores en cáncer

A pesar de que se han realizado varios intentos para definir y clasificar los biomarcadores de cáncer utilizando diferentes aproximaciones aún no existe un consenso general. De manera general, cualquier entidad biológica o proceso que conduzca al diagnóstico de cáncer (como pronóstico, tamizaje o evaluación de riesgo), ya sea en la etapa de diagnóstico o post diagnóstico (en el módulo terapéutico y de tratamiento) son potenciales candidatos como biomarcadores de cáncer.

Biomarcador pronóstico: Se basa en poder distinguir las características entre tumores malignos y benignos. Estos biomarcadores pueden ser elegidos basados en el *status* de diferenciación de los tumores y pueden influir las decisiones del clínico relacionadas a las modalidades del tratamiento.

Biomarcador predictivo: Algunas veces referidos como marcador de respuesta, son utilizados exclusivamente para evaluar el efecto de administrar un medicamento específico. Estos biomarcadores permiten al clínico seleccionar un grupo de agentes quimioterapéuticos que funcionaran mejor de manera individual en el paciente.

Marcador farmacodinámico: Es un marcador utilizado para seleccionar las dosis de agentes quimioterapéuticos en un set dado establecido bajo las condiciones del tumor presente.

Biomarcador diagnóstico: Que puedan estar presentes en cualquier etapa durante el desarrollo del cáncer.

Búsqueda de biomarcadores: metodologías, ventajas y desventajas.

Dado el desarrollo de muchas herramientas biotecnológicas, ha existido un interés en su uso para la búsqueda de biomarcadores, misma que ha ido de la mano al desarrollo y robustecimiento de estas tecnologías que sirven para la identificación y evaluación de los potenciales candidatos. Sin lugar a dudas, la búsqueda de marcadores para cáncer pulmonar no ha sido la excepción en este ímpetu y se ha reflejado en un incremento sustancial de reportes acerca de biomarcadores de la enfermedad, sin embargo, autores mencionan que a pesar de que tecnologías como proteómica y microarreglos han contribuido a una voluminosa literatura de más de 150,000 artículos de biomarcadores “descubiertos” menos de 100 han sido validados para su uso en la práctica clínica(38), por lo que es necesaria la evaluación crítica de cada reporte hecho tomando en consideración el impacto y la verdadera demostración hecha a través de la aproximación experimental realizada por los investigadores. Una de las principales barreras que han presentado los biomarcadores ha sido su pobre sensibilidad, por lo cual hasta la fecha la mayoría de los biomarcadores tumorales reportados no son recomendados como una herramienta para diagnóstico temprano de cáncer pulmonar.(32)

Biomarcadores reportados para cáncer de pulmón en tejidos y biofluidos

El cúmulo de conocimientos en esta era post-genómica y el robustecimiento de diversas tecnologías de biología molecular ha generado un gran interés y estudio de búsqueda de biomarcadores moleculares tanto a nivel de tejido, como de biofluidos, líneas celulares.(39), etc. Como enfoque principal de este proyecto de investigación hablaremos de biomarcadores

reportados presentes en biofluidos, donde sin lugar a dudas el más estudiado ha sido suero sanguíneo.

El uso de suero sanguíneo como medio de búsqueda de biomarcadores ha sido utilizado tanto para diagnóstico como pronóstico de este tipo de enfermedad analizando diferentes modalidades, como DNA, RNA y proteínas “libres” circulantes, así como exosomas y células tumorales también circulantes.

Algunos de los marcadores más mencionados como biomarcadores de cáncer pulmonar han sido CEA (Antígeno carcinoembrionario) y el fragmento -19 de citoqueratina (CYFRA 21-1) mismos que han sido evaluados independientemente o en conjunto con CT para diagnóstico de cáncer pulmonar.(32)

En una de las investigaciones más prometedoras Taguchi y cols(40) identificaron una potencial firma molecular que incluye proteínas que previamente no habían sido descritas como asociadas a cáncer pulmonar, realizando su descubrimiento a través de modelos animales y líneas celulares y una posterior validación en grupos prediagnóstico y ya diagnosticados demostrando una concordancia entre los cambios a nivel plasmático modelo murino y suero humano. La relevancia de este estudio es tal que ha sido reconocida por otros investigadores(41) mencionando que esta investigación va un paso más allá de la ciencia de biomarcadores en el pasado que usualmente se limita a una correlación entre el nivel de marcador y la presencia de la enfermedad.

Tabla 3. Biomarcador diagnóstico proteómica candidato para CP identificado en muestras de tejido (42)

Biomarcador diagnóstico	Tipo de cáncer pulmonar	Técnica proteómica
S100	CPCE (Carcinoma pulmonar de células escamosas)	MALDI-TOF-MS
S100 A6	CPCNP	MALDI-MS
S100 A8	CPCE	iTRAQ, LC-Q-MS/MS
S100 A9	CPCE	iTRAQ, LC-Q-MS/MS
SCCA1 (antígeno-1 carcinoma de células escamosas)	CPCE	iTRAQ, LC-Q-MS/MS
Cistatina A	CP (Cáncer pulmonar)	MALDI-TOF-MS
Tubulina (a, b)	CPCP (Carcinoma pulmonar de células pequeñas)	2D-PAGE; 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
UCH-L1 (Hidrolasa carboxi-terminal ubiquitina L1)	CP	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
Peroxirredoxina PRDX4	CPCNP, Adenocarcinoma	1D-LC-ESI-MS/MS; 2D-PAGE, MALDI-MS
PRDX1	CPCNP	2D-PAGE
PRDX2	CPCE	2D-DIGE, MALDI-TOF-TOF
PRDX3	CPCNP	2D-PAGE
PRDX6	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
TIM (triosa-fosfato-isomerasa)	Adenocarcinoma	2D-PAGE, MALDI-MS
	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
MIF (Factor inhibitorio de migración de macrófagos)	CP	MALDI-TOF-MS
CyP-A (Ciclofilina A)	CP Adenocarcinoma	MALDI-TOF-MS 2D-DIGE, LC-MS/MS
TAGLN (Transgelina)	CPCNP	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
CA (Anhidrasa carbónica)	CPCP, CPCNP	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
ENO1 (Alfa enolasa)	CPCNP, CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
14-3-3 g r (SNF)	CP Adenocarcinoma, CPCE	1D-PAGE, nano ESI-MS/MS 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, Q-TOF-MS/MS, 2D-DIGE, MALDI-TOF-TOF
SOD2 (Superóxido dismutasa 2)	Adenocarcinoma, CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, Q-TOF-MS/MS, 2D-DIGE, MALDI-TOF-TOF; 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
HSP73	CPCE	2D-PAGE
HSP90	CPCE	2D-PAGE
Proteína parecida a HSP20	CPCNP	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
HSP70	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
HSP60	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
HSP27	CPCE	iTRAQ, LC-Q-MS/MS
ANXA1	Adenocarcinoma	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, Q-TOF-MS/MS
ANXA2	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
ANXA3	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
ANXA5	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
ANXA6	CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
ACTG1 (Gamma actina)	CPCP, CPCE	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS, 2D-PAGE, MALDI-TOF-MS
Timosina b4	CP, CPCNP	MALDI-TOF-MS
b10	CPCNP	MALDI-MS
CFL1 (Cofilina-1)	Adenocarcinoma	2D-PAGE, ESI-Q-TOF-MS/MS

Tabla 4. Biomarcadores diagnóstico proteómicos para cáncer de pulmón identificados en muestras de biofluidos. (42)

Biomarcadores diagnóstico	Tipo de muestra	Tipo de cáncer pulmonar	Técnica proteómica que condujo a su identificación
CLU (Clusterina)	Orina, suero	Adenocarcinoma, CPCE	1D-PAGE, HPLC-MS/MS 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
Gelsolina	Orina, Suero, Efusión pleural, Plasma	Adenocarcinoma	1D-PAGE, HPLC-MS/MS iTRAQ, LC-MS/MS
LRG1 (Glicoproteína alfa 2 rica en leucinas)	Orina, Suero	Adenocarcinoma CP, CPCNP	1D-PAGE, HPLC-MS/MS 2D-DIGE, LC-MS/MS 1D-PAGE, nanoHPLC-MS/MS
SAA (Amiloide A sérico)	Suero, Efusión pleural	CP, CPCNP, Adenocarcinoma, CPCE	SELDI-TOF-MS; MALDI-MS MALDI-TOF-MS 2D-PAGE, MALDI-TOF-PMF 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS 1D-PAGE, LC-ESI-MS/MS
HP (Haptoglobina)	Suero, Plasma, Saliva	CP, CPCNP, CPCP, CPCE, Adenocarcinoma	2D-DIGE, LC-MS/MS; 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS 2D-DIGE, MALDI-TOF/TOF 2D-PAGE, MALDI-TOF-PMF 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS1D-PAGE, LC-ESI-MS/MS [2D-DIGE, MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS
TTR (Transtiretina)	Suero	CP, Adenocarcinoma	SELDI-TOF-MS, 2D-PAGE, MALDI-TOF-PMF
Componente del complemento C4	Suero	CP	2D-DIGE, LC-MS/MS
C3, C3c	Suero	CP, SCC	2D-DIGE, LC-MS/MS ; 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
A1AT (alfa-1-antitripsina)	Suero, Efusión pleural, Plasma	CP, Adenocarcinoma	2D-DIGE, MALDI-TOF-MS iTRAQ, LC-MS/MS
Apolipoproteína A1	Suero	Adenocarcinoma	2D-PAGE, MALDI-TOF-PMF
A4	Suero	SCC	2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
CK8 (Citoqueratina 8)	Efusión pleural, plasma	Adenocarcinoma	iTRAQ, LC-MS/MS
AHSG (HS glicoproteína alfa 2)	Efusión pleural, suero	CP, SCC	1D-PAGE, LC-ESI-MS/MS 2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
S100A8 y S100A9	Efusión pleural, suero	NSCLC	2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
SCCA1 (Antígeno-1 de carcinoma de células escamosas)	Suero	CP	2D-DIGE, MALDI-TOF-MS
C C3	Efusión pleural, Plasma	CP Adenocarcinoma	1D-PAGE, LC-ESI-MS/MS iTRAQ, LC-MS/MS

Antecedentes de biomarcadores para cáncer de pulmón en saliva

Desde décadas pasadas es posible encontrar el razonamiento que a través de diversos fluidos es factible encontrar marcadores para distintos tipos de cáncer, incluyendo pulmonar, sin embargo, por ser los más intuitivos generalmente solo incluían al estudio del suero, plasma, efusión pleural, lavado bronquio alveolar y exhalaciones. La saliva no era incluida dentro de esta consideración aunque actualmente se encuentra como un biofluido emergente con gradual aceptación dentro de los diferentes medios con potencial diagnóstico de esta enfermedad. (43)

En el año 2012, Xiao H y colaboradores usando un abordaje proteómico, reportaron que la presencia combinada de 3 marcadores proteicos en saliva (Calprotectina humana, Haptoglobina [HP] y zinc-alfa-2 glicoproteína [AZGP1]) podía discriminar entre sujetos sanos y sujetos con cáncer pulmonar (incluyendo distintos subtipos) con una sensibilidad del 88.5%, especificidad del 92.3% y área bajo la curva de 0.90, convirtiéndose así en el primer grupo de investigación que identifica una firma molecular en saliva para cáncer pulmonar. (44)

El mismo grupo de David T. Wong describió que a través del estudio del RNA mensajero total presente en saliva se podía establecer una firma molecular compuesta por el transcrito diferencialmente expresado de 5 genes (CCNI, EGFR, FGF19, FRS2 y GREB1) y que podía diferenciar entre un grupo de sujetos con cáncer de pulmón y un grupo control con un valor de área bajo la curva de 0.925 con 93.7% de sensibilidad y 82.81% de especificidad en un grupo pre-validación independiente del grupo descubrimiento.(45)

Por su parte, Lix y colaboradores afirman que a través de estudios de espectroscopia Raman incrementado por superficie (SERS) encontraron que a partir de muestras de saliva se hallaban nueve picos (asignados a aminoácidos y ácidos nucleicos) que podían distinguir entre 2 grupos, un grupo de sujetos con cáncer de pulmón y un grupo control. Además realizando un análisis de componente principal y discriminante lineal obtenían una precisión, sensibilidad y especificidad de 80, 78 y 83% respectivamente. (46)

JUSTIFICACION

Actualmente existe una búsqueda de potenciales biomarcadores a través de biofluidos para distintas enfermedades incluyendo distintos tipos de cáncer pues se sabe que los biomarcadores pueden tener la capacidad para evaluar distintos aspectos de las enfermedades ya que pueden ser estudiados e implementados como medio diagnóstico, pronóstico, de respuesta a tratamiento, etc. Además, su uso puede complementarse junto con otras herramientas para hacer más preciso los objetivos clínicos o de estudio.

El suero/plasma sanguíneo ha sido el biofluido más estudiado en búsqueda de biomarcadores para diferentes enfermedades, pero existe evidencia que otros biofluidos de más fácil obtención (p.ej: saliva, orina) también pueden contener información molecular sobre lugares anatómicos distantes de los tejidos que los originan, por lo que existe un interés creciente en utilizarlos como medios diagnóstico sencillos y baratos que puedan ser implementados para realizar tamizajes en grupos poblacionales en riesgo de padecer alguna enfermedad.

La saliva como biofluido para búsqueda de biomarcadores ha demostrado gran potencial, lo que lo ha puesto en escena estos últimos años, a pesar de ser poco estudiado en esta materia. Existe evidencia que demuestra a cómo pasan a formar parte de este biofluido moléculas que viajan a través del torrente sanguíneo o como producen un cambio los perfiles de expresión y subsecuentemente las biomoléculas secretadas por su tejido de origen (glándulas salivales).

Se han realizado estudios “prueba del concepto” y traslacionales que demuestran que es posible encontrar potenciales biomarcadores para tumores malignos distantes de las glándulas salivales y cavidad bucal, algunos ejemplos de estos son: cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, etc.

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país y en el mundo. El mayor factor de riesgo es el tabaquismo pues aproximadamente el 80% de los casos están asociados a este hábito. Aunque existen nuevas herramientas terapéuticas, los nuevos tratamientos logran un modesto incremento de la sobrevivencia de los pacientes.

Como en la mayoría de los tipos de cáncer, la implementación de un esquema de detección temprana tiene un impacto muy positivo en las tasas de curación de la enfermedad por lo que el desarrollo de pruebas diagnóstico favorecería a las poblaciones en riesgo, así como a aquellos sujetos de riesgo por exposición laboral y a otros agentes.

Se han investigado diversos biofluidos en búsqueda de biomarcadores para cáncer de pulmón como suero, esputo, orina, lavado bronquial, etc. Sin embargo, hasta la fecha ninguno ha alcanzado la validación clínica y por lo tanto, no se han implementado como herramienta diagnóstico o de tamizaje poblacional. La única herramienta validada para realizar tamizajes es la tomografía computada helicoidal; sin embargo, en un país como México puede ser no factible su implementación debido a sus altos costos y por su parte otros abordajes como las tomas de

biopsias y lavados bronquiales debido a su naturaleza invasiva son inadecuadas y poco probables para el tamizaje de poblaciones de alto riesgo.

Todo esto pone en relevancia a la saliva como un medio muy atractivo para el tamizaje de enfermedades, ya que es accesible y no invasivo. La saliva refleja el estado de salud y es un reservorio de analitos que proceden de fuentes sistémicas las cuales llegan a la saliva a través de diferentes vías. La composición de la saliva refleja los niveles de marcadores hormonales, inmunológicos, toxicológicos e infecciosos por lo tanto ofrece la posibilidad de monitorear el estado de salud tanto local como sistémica.

La posibilidad de contar con herramientas de escaneo a gran escala, como la proteómica, facilita la identificación de patrones de biomarcadores. Por lo anterior, en este estudio se plantea la posibilidad de identificar proteínas presentes en el proteoma de saliva y que permitan distinguir a grupos de sujetos con y sin adenocarcinoma pulmonar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que existe evidencia sobre la posibilidad de encontrar biomarcadores en saliva, para tumores distantes de cavidad bucal, utilizando herramientas de estudio de expresión global de biomoléculas, como proteómica (Geles bidimensionales/ Espectrometría de masas/ Inmunoensayos), nosotros nos planteamos como pregunta: ¿Existe una expresión diferencial, entre el proteoma salival de sujetos con y sin adenocarcinoma pulmonar, que conduzca a la identificación y posterior validación de potenciales biomarcadores para la enfermedad?

HIPOTESIS

Si sabemos que existe evidencia acerca de la factibilidad de usar a la saliva como un biofluido para la detección de tumores distantes de la cavidad bucal y además contamos con herramientas que permiten evaluar la expresión global de proteínas, planteamos como hipótesis que a través de la comparación de perfiles proteómicos salivales (Geles bidimensionales/ Espectrometría de masas) se identificarán expresiones diferenciales o únicas entre un grupo caso y control de sujetos con adenocarcinoma pulmonar y posteriormente se validarán potenciales biomarcadores a través del uso de una técnica inmunoensayo (ELISA) en un grupo independiente de individuos clasificados como casos y controles.

OBJETIVO GENERAL

A través de la realización de geles bidimensionales, espectrometría de masas e inmunoensayos se pretende definir, comparar, establecer y validar la expresión diferencial entre el proteoma salival de sujetos con y sin adenocarcinoma pulmonar para identificar potenciales biomarcadores de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estandarizar las técnicas y procedimientos para el estudio del complejo de proteínas presentes en el biofluido salival.
2. Comparar mediante una estrategia basada en la realización de geles bidimensionales la expresión diferencial entre dos grupos (casos y controles) de sujetos de proteínas presentes en el proteoma salival.
3. Identificar a las proteínas que tuvieron una expresión única o diferencial en los geles bidimensionales del grupo de sujetos casos mediante espectrometría de masas.
4. Validar las proteínas previamente mencionadas a través de inmunoensayos en grupos independiente de pacientes con y sin la enfermedad.

METODOLOGIA

Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo **observacional analítico, de casos y controles**, y constó de 2 fases:

Una primera fase de **descubrimiento** y una segunda **fase de validación**. (Figura 9)

Todos los individuos que participaron en el estudio fueron reclutados en los siguientes institutos de salud y educación: Instituto Nacional de Cancerología (INCan), clínica de tabaquismo de la facultad de medicina UNAM, Instituto nacional de enfermedades respiratorias (INER), Servicio de neumología y clínica de tabaquismo del Hospital General de México, Posgrado de la facultad de odontología UNAM e Instituto nacional de medicina genómica (INMEGEN).

Al momento de la colección de la muestra se llenó cuestionario estructurado (Anexo 1) que incluyó datos sociodemográficos, antecedentes heredofamiliares, así como variables relacionadas con la enfermedad de interés. Los sujetos que cumplieron los criterios de selección, los cuales se describen a continuación, fueron invitados a participar en el estudio y se les pidió antes de donar la muestra la firma de un consentimiento informado (Anexo 2) aprobado por el instituto correspondiente donde se tomó la muestra, posteriormente se les pidió que bajo un protocolo explicado de manera amena donaran una muestra de saliva.

En la fase de descubrimiento se incluyeron 12 individuos:

6 fumadores con cáncer de pulmón

6 fumadores sin cáncer de pulmón

En la fase de validación se incluyó un grupo independiente de 111 muestras de las cuales se clasificaron en los siguientes grupos:

20 No fumadores sin cáncer

32 Fumadores sin cáncer

28 Fumadores con cáncer

31 No fumadores con cáncer

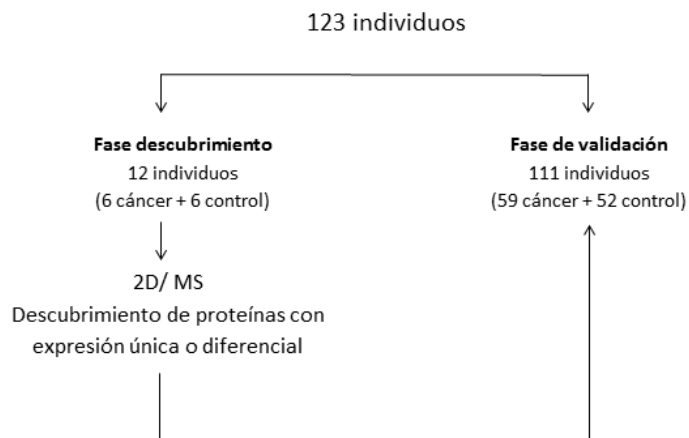


Figura 9. Diagrama de distribución de la muestra (123 individuos) para la estrategia para la identificación y validación de las proteínas de interés.

Criterios de Selección

A continuación se describen los criterios de inclusión para los individuos que formaron parte de la fase descubrimiento:

Grupo I. Fumadores con diagnóstico de adenocarcinoma

1. Sexo: Masculino
2. Edad: 40 años o más
3. Con historia previa de tabaquismo
4. Diagnóstico confirmado de adenocarcinoma pulmonar

Grupo II. Fumadores sin diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar

1. Sexo: Masculino
2. Edad: 40 años o más
3. Fumador activo o que haya cesado hace menos de 6 meses
4. Sin diagnóstico previo de cáncer

Criterio de Eliminación

1. Muestra inadecuada para extracción de proteínas
2. Concentraciones insuficientes de proteínas
3. Pacientes que decidieron salir del estudio

A continuación se describen los criterios de selección utilizados en el presente estudio para clasificar dentro de las 4 categorías principales a los individuos que participaron en la fase validación:

Criterios de Inclusión

Grupo I. No fumadores sin diagnóstico de adenocarcinoma

5. Sexo: Masculino o Femenino
6. Edad: 40 años o más
7. Sin historia de tabaquismo
8. Sin diagnóstico previo de cáncer

Grupo II. Fumadores sin diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar

5. Sexo: Masculino o Femenino
6. Edad: 40 años o más
7. Fumador activo o que haya cesado hace menos de 6 meses
8. Sin diagnóstico previo de cáncer

Grupo III. Fumadores con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar

1. Sexo: Masculino o Femenino
2. Edad: 40 años o más
3. Fumador activo o que haya cesado hace menos de 6 meses
4. Diagnóstico histopatológico confirmado de adenocarcinoma pulmonar
5. Sin tratamiento previo
6. Cualquier estadio

Grupo IV. No fumadores con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar

1. Sexo: Masculino o Femenino
2. Edad: 40 años o más
3. Sin historia de tabaquismo
4. Diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma
5. Sin tratamiento previo
6. Cualquier estadio

Criterio de Eliminación

4. Muestra inadecuada para extracción de proteínas
5. Concentraciones insuficientes de proteínas
6. Pacientes que decidieron salir del estudio

Toma de muestra, procesamiento y almacenamiento

La recolección de saliva se realizó de acuerdo al protocolo de Wong y cols., (47) con ligeras modificaciones. Se colectó saliva no estimulada entre las 9 y 11 am. Una hora antes de la recolección los sujetos se abstuvieron de comer, beber y/o fumar, pidiéndoles hacer un enjuague previo con agua potable 5 minutos antes de empezar a donar la muestra; posteriormente, se le pidió al sujeto que permitiera la acumulación del fluido salival en el piso de la boca y cada 2 minutos lo escupiera dentro de un tubo Falcon de 50 mililitros que se mantuvo dentro un vaso con hielo escarchado. El periodo de colección tuvo una duración de no más de 30 minutos, y como mínimo ideal se requerían 5 mililitros de saliva donada.

Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio para ser procesadas mediante centrifugación a 15,000 revoluciones por minuto (rpm) para permitir la separación del sobrenadante y el pellet (células, debris). El sobrenadante se separó en alícuotas de 1 mililitro (mL) contenidos en viales y se le añadió 3 inhibidores de proteasas: Aprotinina, Ortovanadato de Sodio y PMSF (Feni-metil-sulfonil-fluoruro). Se asignó a los viales un número serial para su identificación, el cual también fue colocado en la hoja de colección de datos y todas las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso (Anexo 3).

Extracción y cuantificación de proteínas

Durante el presente estudio se realizaron dos protocolos distintos (ver Figura 10) durante la fase de descubrimiento y validación tanto para la extracción como para la cuantificación de proteínas. A continuación se describen ambos procedimientos:

El protocolo de extracción de proteínas para la fase de descubrimiento fue el siguiente: una vez elegidas, se puso a descongelar las muestras a temperatura ambiente para posteriormente precipitar las proteínas toda la noche utilizando una solución de ácido tricloroacético a relación 1:1 (TCA 5%). Al día siguiente se utilizó un dispositivo AMICON para dializar y concentrar la muestra y finalmente se procesaron utilizando el kit Clean Up (Amersham Biosciences) para eliminar todo rastro de lípidos, polisacáridos y sales. Una vez realizados estos procedimientos se procedió a realizar la cuantificación de las muestras utilizando el kit 2D Quant (Amersham Biosciences).

En la fase de validación el protocolo de extracción y cuantificación fue modificado, quedando establecidas de manera general las siguientes condiciones: Una vez elegida la muestra, se puso a descongelar a temperatura ambiente y por cada mililitro de saliva en un tubo eppendorf se añadió 1 mililitro de una solución que incluía 10% TCA, 20 mM DTT y acetona y se incubó la muestra por un período de 2 horas a 4°C. Una vez pasado el periodo se realizó centrifugación (10,000 rpm), se eliminó el sobrenadante y se adicionó una solución que contenía 20 mM DTT con acetona;

nuevamente se centrifugó la muestra y se eliminó la solución DTT con acetona. Al botón en el fondo del tubo se resuspendió en un buffer de fosfatos 6.7 mM pH 7.4 (Fosfato de sodio monobásico 0.2M, fosfato de sodio dibásico anhidro 0.2M, Cloruro de potasio 0.04 mM, y Cloruro de Magnesio 1mM). Las muestras fueron cuantificadas con el kit de proteínas *Assay Dc* de BioRad en placas para ELISA de 96 pozos, utilizando como curva estándar diversas concentraciones de BSA diluido en buffer de fosfatos y midiendo la absorbancia en lector de placas a longitud de onda 750 nm.

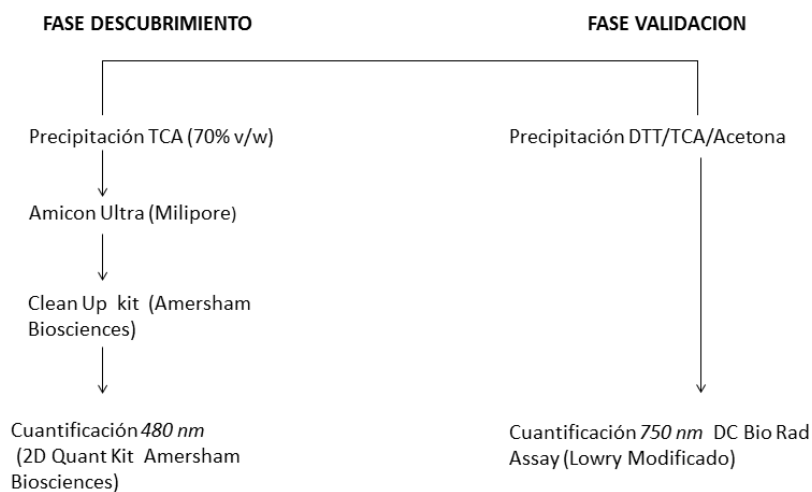


Figura 10. Diagrama de la preparación para la extracción y solubilización de proteínas a partir de las muestras de saliva en la fase descubrimiento y validación.

Realización de geles bidimensionales, tinción, análisis de expresión diferencial e identificación por espectrometría de masas

(La realización de geles bidimensionales, tinción, análisis de puntos e identificación por espectrometría de masas estuvo a cargo de la unidad de proteómica médica del INMEGEN, sin embargo, se describen a continuación los procedimientos y métodos utilizados en la realización de estas técnicas.)

Ya seleccionados 6 pacientes de cada grupo (Tabla 5 y 6) y realizada la extracción y cuantificación de proteínas se mezclaron las muestras por grupo calculando que cada sujeto aportara un total de 30 microgramos (μg) para finalmente tener incluido un total de 180 μg por mezcla. Posteriormente cada mezcla de proteínas se utilizó para realizar los geles bidimensionales como se describe a continuación.

Electroforesis bidimensional

Primera dimensión. Se utilizaron tiras no lineales de 7 cm con un gradiente de pH de 3 a 10 la cual fue rehidratada aproximadamente 16 horas con la muestra diluida en 125 μl de buffer de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2% y anfotitas de pH 3-10 al 0.05%, 0.625 mg de DTT). Después de la rehidratación, se sometió la tira a un proceso de isoelectroenfoque (1D) en el equipo Ettan IPG-Phor 3 (GE Healthcare).

Segunda dimensión. Inmediatamente después, la tira se sometió a los procesos de reducción y alquilación utilizando buffer de equilibrio (urea 6M, Tris-HCl 75 mM, glicerol 29.3%, SDS 2%). Para reducir los puentes disulfuro, se añadieron 100 mg de DTT en 10 mL de buffer de equilibrio, en el cual se colocó la tira y se dejó incubar en agitación por 10 minutos, posteriormente se removió la solución y se le adicionó 10 mL de buffer de equilibrio conteniendo 250 mg de iodoacetamida, con la finalidad de alquilar los grupos **SH** libres. Una vez concluido el proceso de equilibrio, se colocó la tira en un gel de poli(acrilamida) al 13.5% (SDS-PAGE) y se selló con agarosa al 0.5%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 60V hasta que las proteínas de la tira entraran al gel y posteriormente se aumentó a 100 V hasta el final de la corrida.

Tinción, escaneo de geles bidimensionales para detectar puntos diferencialmente expresados

Una vez obtenidos los geles bidimensionales de casos y controles (3x) se utilizó la tinción fluorescente total Sypro Ruby (Invitrogen) para observar la separación de las proteínas en los geles. Inmediatamente después se realizó un escaneo de los geles con el Equipo Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Inc). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare Inc) y los artefactos fueron eliminados manualmente, analizando cada una de las imágenes. Posteriormente, se realizó el empalme de todas las imágenes, tanto de casos como de controles, para poder determinar los puntos presentes y ausentes dependiendo del tipo de muestra.

Una vez identificados aquellos puntos de interés se imprimió una plantilla de acetato y se colocó encima del gel bidimensional que mejor resolución había tenido, y se realizó el “picado” con una punta de micropipeta previamente lavada con etanol al 70%. Los puntos picados fueron lavados múltiples veces para eliminar todo rastro de tinción y químicos inhibidores. Finalmente fueron aislados en un tubo eppendorf de manera individual y almacenados hasta el análisis mediante espectrometría de masas (MS).

Espectrometría de masas

Para ser analizados los puntos, fueron secados al vacío y rehidratados con buffer de digestión que contenía 15 μ L de tripsina modificada (20 μ g/mL) (Promega, Madison, WI). La digestión se realizó toda la noche a 37°C. Los péptidos digeridos fueron extraídos del gel con buffer de extracción que contenía ácido trifluoroacético manteniendo en continuo movimiento.

A continuación fueron desalados los péptidos trópticos digeridos usando C-18 Zip-tips (Millipore, Billerica, MAC) y mezclados con matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) y colocados en los pozos de la placa del MALDI para ser identificados con el aparato MALDI-TOF MS/MS (ABI4800). La identificación de las proteínas se basó en fragmentar el ion precursor para la identificación del péptido por MS/MS (utilizando el espectro MS/MS).

Búsqueda bioinformática

El espectro MS/MS fue sometido para búsqueda en base de datos utilizando el software Protein Pilot (ABI) que el cual está equipado con el algoritmo Paragon (versión 2.0.1, <http://www.matrixscience.com>) para identificar proteínas no redundantes de la base de datos *Protein Knowledgebase* (UnitProt). Los **parámetros de análisis** utilizados fueron: tripsina como enzima utilizada para la digestión, iodoacetamida como agente modificador de las cisteínas por alquilación, *homo sapiens* como especie para búsqueda de proteínas, búsqueda en modo exhaustivo, ID Focus: Modificaciones biológicas y sustituciones de aminoácidos. Se establecieron como **parámetros de resultados**: umbral de detección proteica [*Unused ProtScore (Conf)*] >: 2.00 (99.0 %) y margen de error competidor (ProtScore): 2.00.

El algoritmo Paragon es un algoritmo desarrollado por la compañía y publicado en el año 2006 (48) que permite la identificación de mayor número de modificaciones y cortes en una sola búsqueda intensiva. Usando una **metodología característica de probabilidad**, busca a través de más 150 modificaciones, variantes génicas y otras características peptídicas. Las búsquedas se pueden realizar en 2 modos: Rápido o Exhaustivo. En el presente estudio se utilizó el modo exhaustivo, que, aunque implica el triple del tiempo para obtener las identificaciones, permite identificar un mayor número de péptidos buscando a través de un gran número de posibles modificaciones, cortes inesperados y sustituciones de aminoácidos. Todas las modificaciones que busca las realiza a través de la base de datos UniMod (www.unimod.org).

Una vez realizada la identificación de los péptidos el programa despliega la confianza del péptido mostrándolo resaltando 3 colores distintos: Verde, confianza mayor o igual a 95; Amarillo, confianza entre igual o mayor a 50 y menor a 95; Rojo, confianza entre mayor a 0 y menor a 50.

Realización de geles de SDS-PAGE

Se realizaron geles desnaturalizantes unidimensionales (SDS-PAGE) al 10%. Se prepararon 2 soluciones buffer para el gel separador (Acrilamida/Bis 30% T, 2.67% C, 1.5M Tris, pH 8.8, SDS 10%, ddH₂O, TEMED, PSA 10%) y el gel concentrador (Acrilamida/Bis 30%, 1.5M Tris, pH 6.8, SDS 10%, ddH₂O, TEMED, PSA 10%). El buffer del gel separador fue sometido a vacío para desgasificación alrededor de 15 minutos. Inmediatamente añadidos los reactivos catalizadores de la polimerización (Temed + PSA) las soluciones que componen al gel separador y concentrador eran vertidas, respectivamente, en el sistema Mini-PROTEAN (Bio-RAD) para realizar los geles de electroforesis que incluye cristales con grosor de 1 mm montados en el marco y este a su vez en el soporte. Inmediatamente colocada la solución del gel concentrador se colocaban peines con una distribución para 10 pozos.

Una vez polimerizados los geles se montaron en la cámara de electroforesis vertical y se llenó el tanque con Buffer de Corrida (Tris pH 8.3, Glicina, SDS). Las muestras de proteínas (30 µg) con Buffer Laemli + β-mercaptoetanol (1:1) se cargaban en el pozo correspondiente, incluyendo en el carril del extremo izquierdo un marcador de peso molecular. Posteriormente se permitió correr los primeros 20 minutos a 80V y después se subió a 120V permitiendo siguieran migrando las proteínas alrededor de 90 minutos o hasta que el frente de corrida empezara a salirse, inmediatamente se desmontaron los geles y se realizaban 3 lavados con agua corriente, colocándolos al final en solución de azul de Coomassie (10% ácido acético, Azul de Coomassie 0.006%, ddH₂O 90%). Se tiñeron durante toda la noche y al día siguiente se colocaron en solución de destañido (Agua, Ácido acético 10% y metanol 50%). Posteriormente los geles eran escaneados en el fotodocumentador Gel Doc XR+ System (BIO-RAD).

Realización de ensayo ELISPOT

Se montó una membrana de PVDF en una placa de 96 pozos colocando lo calculado para 5 µg de proteína en cada pozo; cada muestra fue analizada por triplicado (3x). Mediante sistema de bombeo se hizo vacío durante 10 minutos y al finalizar se verificaba que estaban secas las membranas. Se colocó buffer de fosfatos (PBS) con detergente Tween al 0.15% (Tw) durante una hora y media, para posteriormente realizar dos lavados, y posteriormente incubar anticuerpos primarios (Anti- Calicreína-1 ab31507) (Anti- Anexina A1 Santa Cruz sc-1923) y (Anti-Calreticulina Abcam ab70013) dejando incubar durante un periodo de 2 horas. Transcurrido el tiempo establecido se realizaron 3 lavados con solución PBS-Tw y se incubó el anticuerpo secundario correspondiente para cada anticuerpo, dejando incubar durante un periodo de 1 hora. Se reveló con Diaminobencidina. Finalmente se escanearon las membranas.

Realización de ensayo ELISA

Los ensayos ELISA se realizaron en placas *Maxisorb* de 96 pozos con fondo plano. Se calculó para cada muestra lo correspondiente a 1 µg y se diluyó en buffer de carbonatos (NaHCO₃ 0.07M, Na₂CO₃, pH 9.6). Cada muestra se analizó por triplicado. Los anticuerpos evaluados fueron Anti- Calicreína-1 (ab31507) Anti-Anexina A1 (Santa Cruz sc-1923) y Anti-Calreticulina (Abcam ab70013). Las muestras se incubaron toda la noche para lograr la mayor absorción posible, posteriormente se realizaron lavados (3x) con solución PBS-Tw y se dejó incubar el anticuerpo primario correspondiente durante un período de 2 horas una vez cumplido fueron realizados lavados con PBS-Tw (3x) para continuar con la incubación del anticuerpo secundario correspondiente (81-6120 Invitrogen anti-conejo dilución 1:5,000 para ab3107 y ab70013; sc-2350 anti-cabra dilución 1:5000) durante un periodo de una hora. Una vez cumplido el tiempo se realizaron 3 lavados finales y se procedió a revelar, utilizando HRP-H₂O₂, y a medir absorbancias en lector de placas a 450 nm. Se normalizaron los valores restando el promedio del triplicado de cada muestra contra el valor de un control negativo (Figura 11) (Anexo 4)



Figura 11 Ejemplo gráfico de disposición gráfica de los controles negativos y una muestra por triplicado para la realización de los ensayos ELISA.

Pruebas estadísticas realizadas

Para evaluar las características de los sujetos que conformaron parte de este estudio se realizó como estadística: media, mediana, rangos y desviación estándar para variables sociodemográficas, clínicas y experimentales. Para evaluar la expresión de los anticuerpos para las proteínas de interés se realizó **test de Shapiro Wilk** para determinar el tipo de distribución de esta variable experimental para cada uno de los anticuerpos. Una vez determinado se aplicó prueba no paramétrica (**Kruskal Wallis**) para la evaluación de las diferencias entre los diferentes grupos en su expresión. Posteriormente se hizo la **prueba de Tukey** para comparaciones múltiples y determinar cuál o cuáles grupos diferían entre sí. Se realizaron gráficos de boxplot para la demostración gráfica de las diferencias entre los distintos grupos. Los datos fueron analizados en el programa estadístico SPSS para Windows (Versión 15.0) y en R. (Versión 3.0.1) En todas las pruebas estadísticas, se consideró como nivel de significancia al 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Protocolo de colección, procesamiento y almacenamiento de muestras de saliva

El protocolo de colección de muestra de saliva establece la colección en un período definido (9-11 am), la separación de las fracciones y la adición de un coctel de inhibidores de proteasas (**Aprotinina, PMSF, Ortovanadato de Sodio**). Todas las muestras que no fueron colectadas en el tiempo definido, que tenían presencia de esputo, sangre, o moco fueron excluidas para eliminar potenciales variables confusoras.

Durante el presente estudio se utilizaron dos protocolos de extracción y cuantificación de proteínas (Figura 9), uno para la fase descubrimiento y otro para la fase de validación. El protocolo para la fase de descubrimiento involucró la limpieza en varios pasos de las muestras, debido a que la saliva es el biofluido con mayor contaminación. Dados los resultados en cuanto a rendimiento proteico y reproducibilidad experimental (Tabla 6) se decidió modificar el protocolo. El protocolo finalmente establecido en la fase de validación involucraba de manera más sencilla, la extracción sin pasos de limpieza. Los resultados en cuanto a reproducibilidad e integridad de las muestras (Figura 12) nos condujeron a determinar que el segundo protocolo era el más adecuado y quedó finalmente establecido para los experimentos subsecuentes.

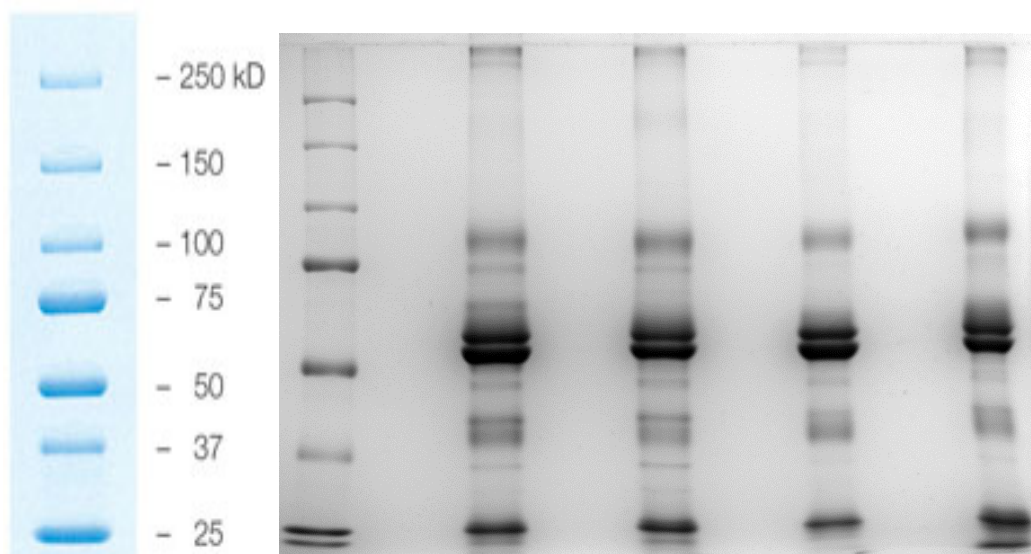


Figura 12. . Gel SDS-PAGE para valoración de integridad de las muestras de saliva de 4 sujetos voluntarios

Las concentraciones medias obtenidas fueron 2 mg/mL y los geles SDS-PAGE mostraron integridad de las distintas muestras con los patrones clásicos de separaciones de muestra de saliva global no estimulada.

Fase descubrimiento

En la primera fase del estudio (descubrimiento) se incluyeron a 12 sujetos masculinos de los cuales 6 eran fumadores con cáncer (Adenocarcinoma pulmonar) y 6 fumadores sin cáncer. Los 6 pacientes con cáncer fueron diagnosticados por el servicio de patología del INCan como adenocarcinomas pulmonar. La media de edad de los casos fue de 62.1 (± 6.55) y para los controles de 53.66 (± 6.18) sin encontrar diferencias significativas entre los grupos. Los promedios de paquetes año entre casos y controles fueron de 24.9 (± 10.73) y 17.91 (± 5.43) respectivamente, y tampoco se encontraron diferencias significativas. A continuación se resume la información antes presentada:

Tabla 5. Fumadores con adenocarcinoma pulmonar

Sujeto	Diagnóstico	Sexo	Edad	Estadio	Condiciones fumador	P.A	Proteínas mg/mL
1	Adenocarcinoma Pulmonar	H	67	III	Fumador	13.2	1.84
2	Adenocarcinoma Pulmonar	H	55	IV	Fumador	35	2.78
3	Adenocarcinoma Pulmonar	H	72	IV	Fumador	23.5	.50
4	Adenocarcinoma Pulmonar	H	63	III	Fumador	14.7	1.5
5	Adenocarcinoma Pulmonar	H	60	IV	Exfumador	23	2.7
6	Adenocarcinoma Pulmonar	H	56	IV	Exfumador	40	2.9

Tabla 6. Fumadores sin adenocarcinoma pulmonar

Sujeto	Diagnóstico	Sexo	Edad	Condiciones fumador	P.A	Proteínas mg/mL
1	Sano	H	55	Fumador	15.5	0.20
2	Sano	H	60	Fumador	18	0.51
3	Sano	H	57	Fumador	20.5	0.30
4	Sano	H	43	Fumador	13.7	0.25
5	Sano	H	50	Fumador	12.5	0.44
6	Sano	H	57	Exfumador	27.3	1.5

Tabla 7. Perfiles de los sujetos

Perfiles clínicos, demográficos y experimentales de los sujetos		
Dato	Fumadores con cáncer	Fumadores sin cáncer
Edad, años	62.1 ± 6.55	53.66 ± 6.18
Rango	55-72	43-60
Sexo	Todos hombres (6)	Todos hombres (6)
Historia previa de tabaquismo	Sí	Sí
Paquetes año	24.9 ± 10.73	17.91 ± 5.43
Concentración de proteínas	9.84 ± 5.56	5.63 ± 4.3

*p=0.93 Edad

+p=0.31 Paquetes año

"p= 0.65 Concentración proteínas

Geles bidimensionales

Como ya se describió en la sección de métodos, muestras de saliva agrupadas en *mezcla* tanto del grupo control y de los casos fueron cargadas en igual cantidad (30 µg de cada sujeto para un total de 180 µg) para la realización de los geles bidimensionales. Posteriormente se tiñeron con Sypro Ruby y se escanearon en el equipo *Image Scanner* para realizar el análisis *In gel*. Se realizó análisis densitométrico para identificar los verdaderos puntos y verificar su presencia en los triplicados, de esta manera se eligió un gel representativo de cada uno de los triplicados y a este se le denominó gel maestro y sirvió para realizar la comparación entre casos y controles (**ver Figura 14**).

Los geles tanto de casos como controles presentaron un patrón de separación de proteínas de saliva similar a lo reportado previamente, donde se encuentran las principales familias de proteínas como, amilasas, inmunoglobulinas, anhidrasas carbónicas, histatinas, y proteínas ricas en prolina (Ver Figura 4). Los puntos se encuentran claramente definidos por lo cual consideramos que las muestras fueron procesadas adecuadamente eliminando rastros de sales o lípidos que pudieran interferir. Sin embargo, la resolución de la primera dimensión no fue completamente satisfactoria, como puede observarse en el lado izquierdo del gel existe un área donde no se resuelve completamente la separación de las proteínas a partir de su punto isoelectrico.

En los geles de los casos se observa mayor abundancia de proteínas a pesar de tener la misma cantidad total cargado. Esto se observó en dos experimentos independientes (Ver **Figura 16**). Asimismo se identificaron mayor número de puntos en el gel de casos. Después de los análisis en gel, se identificaron 20 puntos únicos en el grupo de casos. Estos puntos fueron escindidos, digeridos con tripsinas y posteriormente analizados por MS.

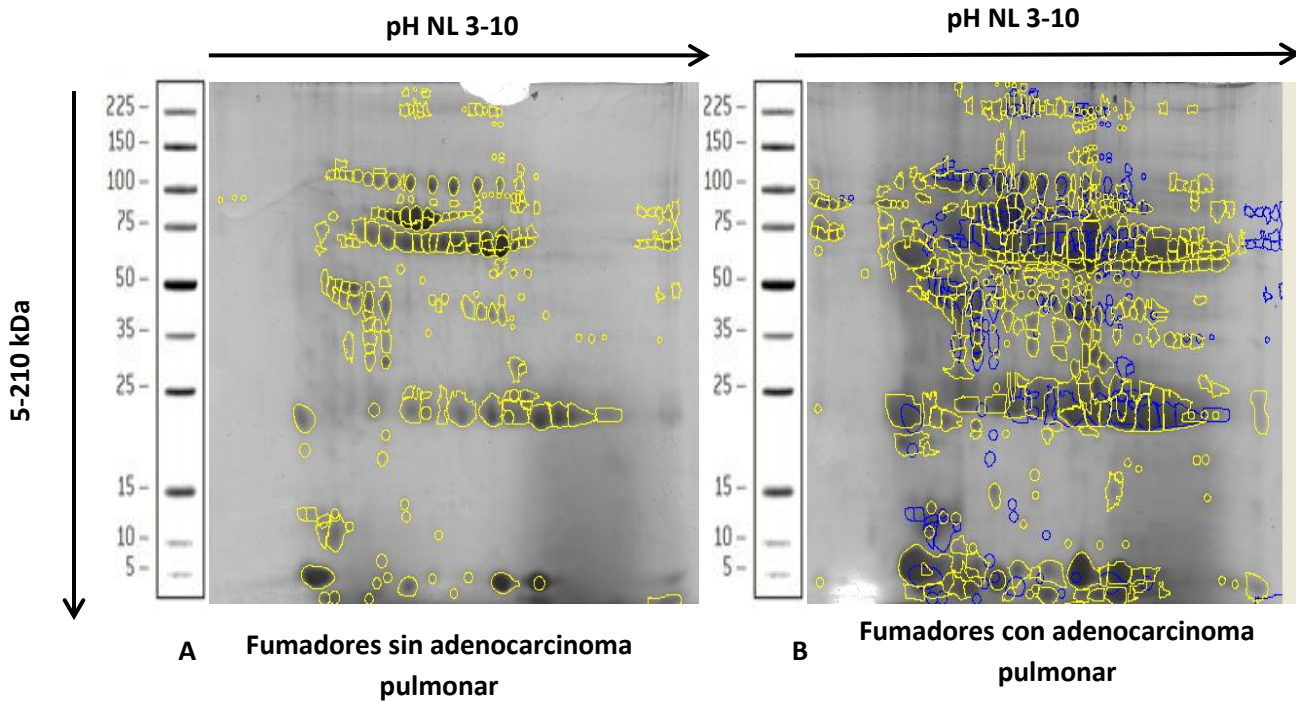


Figura 13. Geles bidimensionales de mezcla de sujetos fumadores sin cáncer (A) y de sujetos fumadores con cáncer (B).

El gel tiene como características que la primera dimensión se corrió en tira de gradiente pH 3-10 NL y peso molecular de 5 – 225 kDa (concentración 13.5% acrilamida y grosor 1 mm). Después del análisis de imágenes se identificaron los puntos señalados (circulo amarillo) que estaban presentes tanto en la condición A como B. En el caso correspondiente del gel B se indican en círculo azul empalmado los puntos que se identificaron en A para identificar manualmente cuales de aquellos puntos estaban presentes en ambas condiciones y cuáles no. Ambas imágenes corresponden a los geles maestro de los dos grupos que fueron los utilizados para los análisis posteriores. Nótese como a pesar de haber sido cargado en total la misma cantidad de proteína en ambos geles, es evidente la discrepancia entre la intensidad de los puntos entre ambos, siendo más notoria en la mezcla correspondiente a los casos. Esto mismo se replicó en los 3 geles correspondientes.

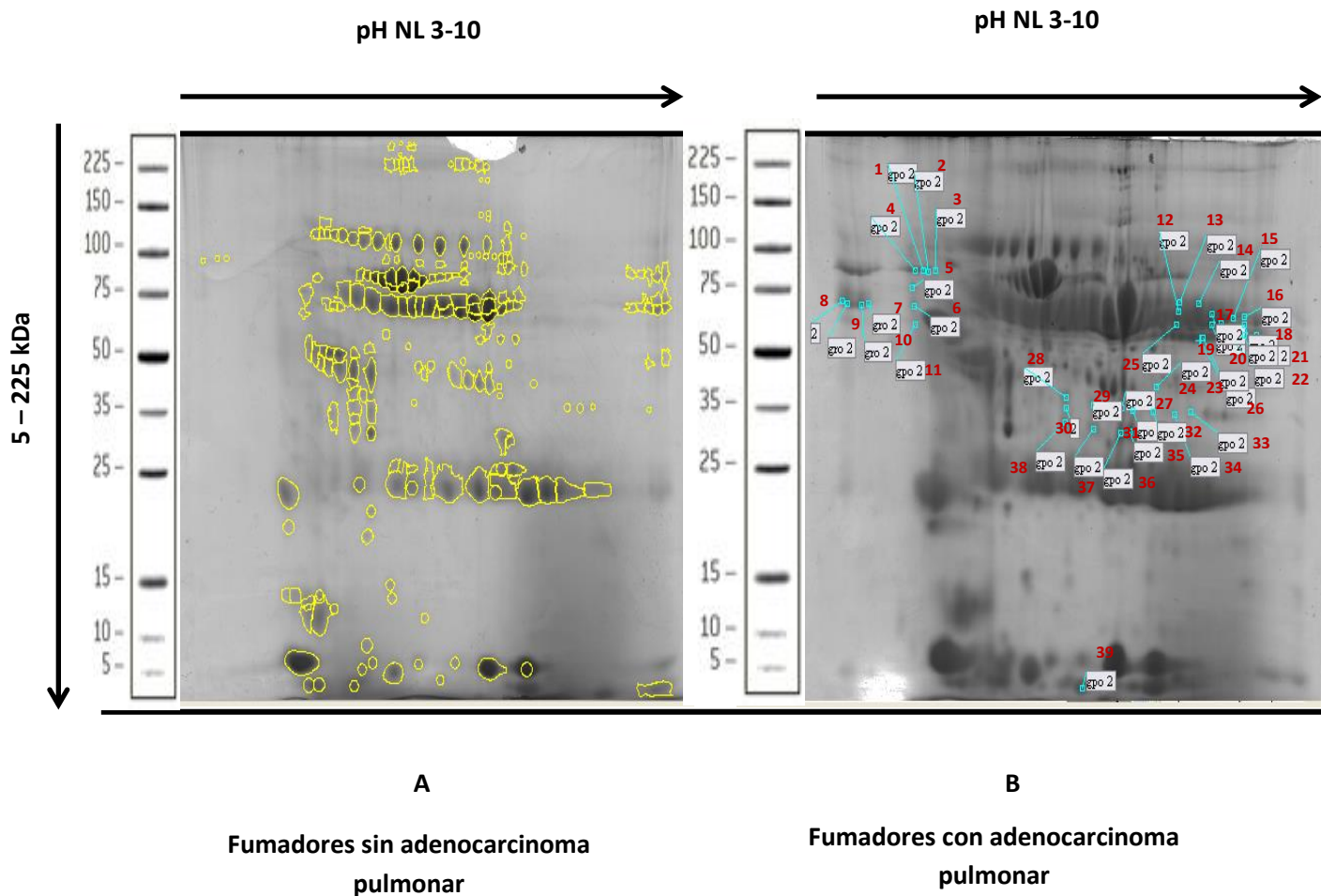


Figura 14. Geles bidimensionales de mezcla de sujetos fumadores sin cáncer (A) y de sujetos fumadores con cáncer (B).

El gel tiene como características que la primera dimensión se corrió en tira de gradiente pH 3-10 NL y peso molecular de 5 – 225 kDa (concentración 13.5 % acrilamida y 1 mm de grosor). Después del análisis de imágenes se identificaron los puntos señalados (circulo amarillo) que estaban presentes tanto en la condición A como B. En el grupo correspondiente a los casos se identificaron 37 puntos que solamente estaban presentes en este gel (señalados con flecha), estos fueron todos los puntos identificados como solo presentes en el mezcla sujetos fumadores con adenocarcinoma pulmonar, sin embargo, no todos los puntos se escindieron para posterior análisis por MS. Los puntos escindidos para futuro análisis (20) se muestran en la Figura 15.

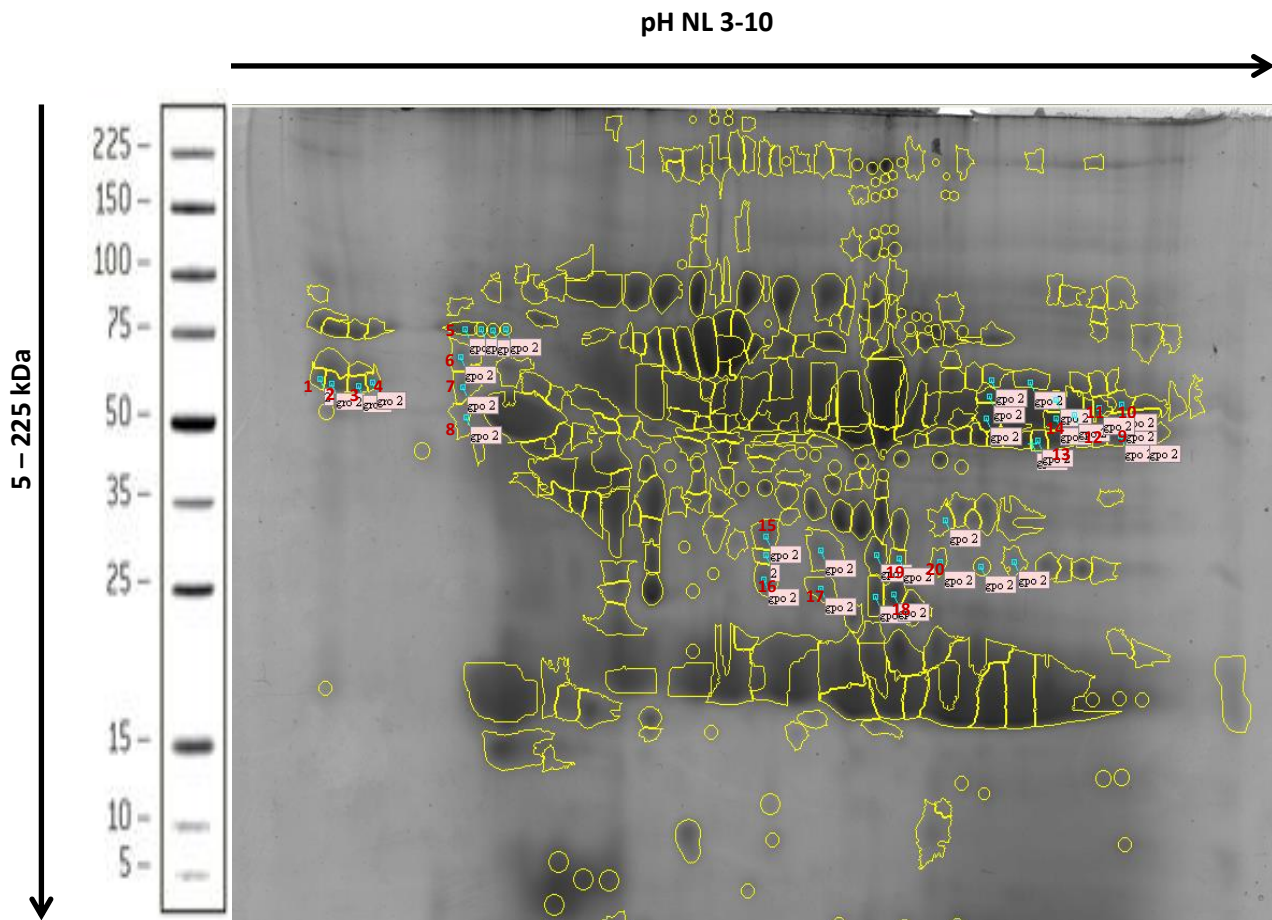
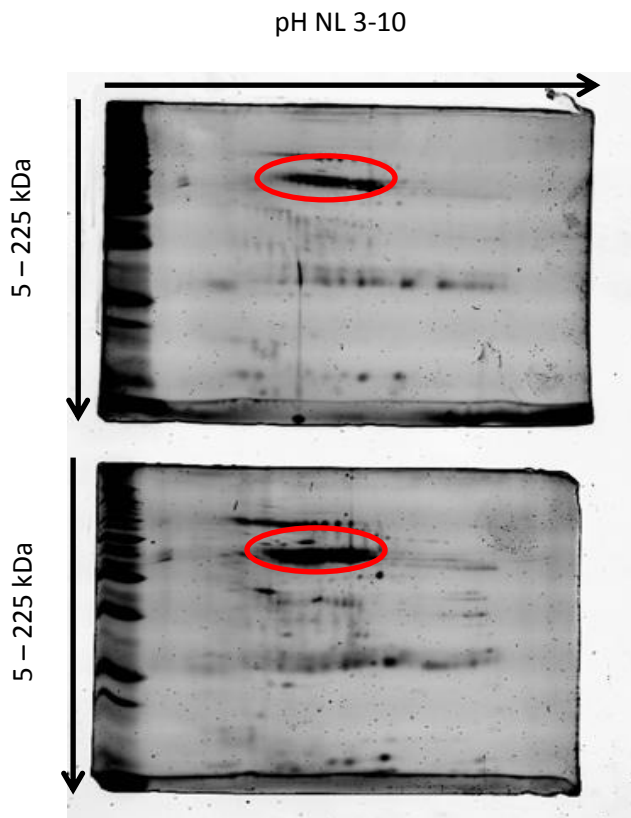


Figura 15. 20 puntos presentes en el gel del grupo de sujetos fumadores (6) con adenocarcinoma pulmonar que fueron escindidos para posterior análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

Debido a la viabilidad para ser escindidos, los puntos marcados en el presente 1-20 se escindieron para identificar las proteínas incluidas en el gel bidimensional del grupo de sujetos hombres fumadores con adenocarcinoma pulmonar para identificarlos a través de espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Las proteínas identificadas dentro de los distintos puntos se indican en la tabla 7 así como en las anotaciones hechas en el mismo gel, una vez identificadas las proteínas, en la Figura 21.

Figura 16. Geles bidimensionales de un sujeto control (D) y un sujeto caso (E).



D Geles bidimensionales de un sujeto control (D) y un sujeto caso (E). Los geles tienen como características que la primera dimensión se corrió en tira de gradiente pH 3-10 NL y peso molecular de 5 – 225 kDa (concentración 13.5 % acrilamida y 1 mm de grosor). Dado que se observó en los geles para la fase descubrimiento una diferencia en la intensidad de los puntos para los dos grupos se decidieron hacer 2 geles de dos sujetos (caso y control) para observar si esta diferencia podía deberse a un error técnico o a un fenómeno biológico. Como se aprecia, nuevamente se ve que la intensidad de los puntos del correspondiente caso (E) es mayor que el control (círculo rojo).

E

Espectrometría de Masas e Identificación por Protein Pilot

Los 39 puntos digeridos fueron cargados en una placa de MALDI, sometidos a espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) y los datos generados fueron buscados por el motor de búsqueda. Se logró la identificación 39 proteínas. De las 39 proteínas identificadas, 15 fueron proteínas no redundantes. Las proteínas identificadas se muestran dentro de los siguientes puntos descritos en la siguiente tabla.

Como control interno se utilizó a la proteína BSA. La búsqueda se realizó utilizando el programa Protein Pilot (ABI) que el cual está equipado con el algoritmo Paragon (versión 2.0.1) para identificar proteínas no redundantes de la base de datos *Protein Knowledgebase* (UnitProt). Los **parámetros de análisis** utilizados fueron: tripsina como enzima utilizada para la digestión, iodoacetamida como agente modificador de las cisteínas por alquilación, *homo sapiens* como especie para búsqueda de proteínas, búsqueda en modo exhaustivo, ID Focus: Modificaciones biológicas y sustituciones de aminoácidos. Se establecieron como **parámetros de resultados**: umbral de detección proteica [*Unused ProtScore (Conf)*] >: 2.00 (99.0 %) y margen de error competidor (ProtScore): 2.00.

Una vez realizada la identificación de los péptidos, despliega la confianza del péptido mostrándolo resaltando 3 colores distintos: Verde, confianza mayor o igual a 95; Amarillo, confianza entre igual o mayor a 50 y menor a 95; Rojo, confianza entre mayor a 0 y menor a 50.

Punto	Proteína	Nombre del gen	No. Acceso	% Cobertura	Péptidos identificados	ProtScore	UnUsedScore	p.I	MW (Da)
1	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	52.8	13	2	24.1	6.64	57,768
	Queratina, tipo II citoesquelética 4	KRT4	P19013	14	6	2	4.85	6.34	57,285
2	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	52.6	12	2	24.2	6.64	57,768
	Queratina, tipo II citoesquelética 6	KRT6C	P48666	30.6	8	2	4.85	7.93	60,025
3	Nada								
4	Albúmina sérica (Precursor)	ALB	P02768	34	13	2	19.48	5.92	69,367
	Transcobalamina-1 (Precursor)	TCN1	P20061	20.1	5	2	6	4.96	48,207
	Proteína UNQ773/PRO1567	ZG16B	Q96DA0	29.8	3	2	5.84	6.74	22,739
5	Albúmina sérica (Precursor)	ALB	P02768	35.1	13	2	22.41	5.92	69,367
	Proteína UNQ773/PRO1567	ZG16B	Q96DA0	20.8	2	2	4	6.74	22,739
	Transcobalamina -1 (Precursor)	TCN1	P20061	12	3	2	2.09	4.96	48,207
6	Albúmina sérica (Precursor)	ALB	P02768	54	18	2	31.58	5.92	69,367
7	Calreticulina (Precursor)	CALR	P27797	12.9	4	2	6.64	4.29	48,142
8	Calreticulina (Precursor)	CALR	P27797	38.4	8	2	16.98	4.29	48,142
	Contaminante								
9	Caliceína-1 (Precursor)	KLK1	P06870	18.7	4	2	3.62	4.58	23,835
	Alfa amilasa salival (Precursor)		P04745	63.6	19	2	30.73	6.64	57,768
	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	36.3	7	2	9.4	6.08	37,655
10	Alfa amilasa salival 2B (Precursor)	AMY2B	P19961	58.5	16	2	2.31	6.64	57,710
	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	63.6	17	2	31.77	6.47	57,768
10	Contaminante								
	Ig gamma 2 región de la cadena C	IGHG2	P01859	2.01	2	2	2.01	7.66	35,901

Tabla 8. Se presentan las proteínas identificadas en los puntos indicados, así como el nombre del gen, el número de acceso, el porcentaje de cobertura de cada una, el número de péptidos identificados, el ProtScore y el UnUsedScore, el punto isoelectrico (p.I) teórico así como el peso molecular. Sólo se reportan aquellas proteínas que tenían una confianza igual o mayor al 99% de probabilidad.

Punto	Proteína	Nombre del gen	No. acceso	% Cobertura	Péptidos identificados	ProtScore	UnUsedScore	p.I	MW (Da)
11	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	64.8	16	2	39.71	6.47	57,768
	Ig alfa-1 región de la cadena C		P01876	41.9	8	2	9.2	6.08	37,655
12	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	58.3	14	2	34.25	6.47	57,768
	Ig gamma-2 región de la cadena C	IGHG2	P01859	36.8	6	2	5.74	7.66	35,901
13	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	60.9	16	2	37.87	6.47	57,768
	Ig gamma-1 región de la cadena C	IGHG1	P01857	16.7	2	2	6	8.46	36,106
	Queratina, tipo II citoesquelética 4	KRT4	P19013	14.2	6	2	2.37	6.25	57,285
14	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	58.7	13	2	30.96	6.47	57,768
	Ig gamma-1 región de la cadena C	IGHG1	P01857	18.2	3	2	2.96	8.46	36,106
15	Nada								
16	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	47.6	8	2	12.55	6.08	37,655
	Contaminante						4		
	C6orf58 (Proteína no caracterizada)	C6orf58	Q6P5S2	13.6	4	2	2.15	5.78	37,926
17	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	26.3	6	2	7.59	6.08	37,655
	Anexina A1	ANXA1	P04083	16.8	4	2	6.54	6.57	38,714
	Contaminante								
18	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	29.7	7	2	9.08	6.08	37,655
	Contaminante					2			
	Contaminante								
19	Anexina A1	ANXA1	P04083	32.7	7	2	6.71	6.57	38,714
	Contaminante								
	Anhidrasa carbónica 6 (Precursor)	CA6	P23280	11.4	2	2	4	6.51	35,627
	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	24.6	5	2	2.52	6.08	37,655
20	Ig alfa-1 región de la cadena C	IGHA1	P01876	45	7	2	9.72	6.08	37,655
	Alfa amilasa salival (Precursor)	AMY1A	P04745	34.6	10	2	9.42	6.47	57,768
	Anhidrasa carbónica 6 (Precursor)	CA6	P23280	16.2	4	2	4.13	6.51	35,627
	Contaminante								

Tabla 8 (continuación).

Dentro de los 20 puntos se identificaron un total de 39 proteínas, a través del experimento de espectrometría de masas MALDI-TOF-MS/MS y realizando la búsqueda de identificación peptídica utilizando el programa Protein Pilot con el algoritmo Paragon. Con una confianza igual o mayor al 99% se identificaron dentro de los veinte puntos un total de 39 proteínas, de las cuales 15 son proteínas no redundantes. Dado que en el momento que se realizó este experimento no se había publicado ningún reporte sobre biomarcadores para adenocarcinoma pulmonar en saliva, se realizó una búsqueda en la literatura sobre si alguna de las 15 proteínas diferentes tenía reporte previo en otro biofluido como potencial marcador para la enfermedad. Se encontró que tres de las 15 proteínas ya contaban con al menos un antecedente de posible biomarcador para cáncer pulmonar, por lo que nos enfocamos en el estudio particular de estas 3 proteínas identificadas en el experimento.

A continuación se presentan los reportes informáticos de las 3 proteínas (Anexina A1, Calicreína-1 y Calreticulina) utilizando el programa Protein Pilot:

Anexina A1

Esta proteína fue identificada en dos puntos: En el punto 17 y 19 (Figura 17) (Figura 18) (Tabla 7).

Punto 17

Se identificaron 4 péptidos perteneciente a la secuencia de proteína (Figura 15, señalado con flecha verde). Tres de los péptidos tuvieron una confianza mayor a 95 (secuencia resaltada en verde) y uno de los péptidos tuvo una confianza entre el 50 y 95 (secuencia resaltada en amarillo).

En la sección media señalada con la flecha azul se muestra la “evidencia de proteínas que se intersectan”; donde se muestra que otras proteínas por compartir homología con las proteínas presentadas también podrían ser hipotéticamente reportadas, sin embargo en este caso particular no se muestra alguna otra proteína. Asimismo se muestran que modificaciones en las secuencias peptídicas presentadas han sido predichas para poder inferir su presencia de las mismas. En este caso se predice que la secuencia del péptido resaltado en amarillo prescinde de un aminoácido (lisina).

En la sección superior señalada con flecha roja se muestran las proteínas que pueden ser reportadas como presentes en el punto además de la proteína mencionada, por lo tanto, se identificó junto con Anexina A1 a Ig alfa-1 región de la cadena C y a una proteína contaminante.

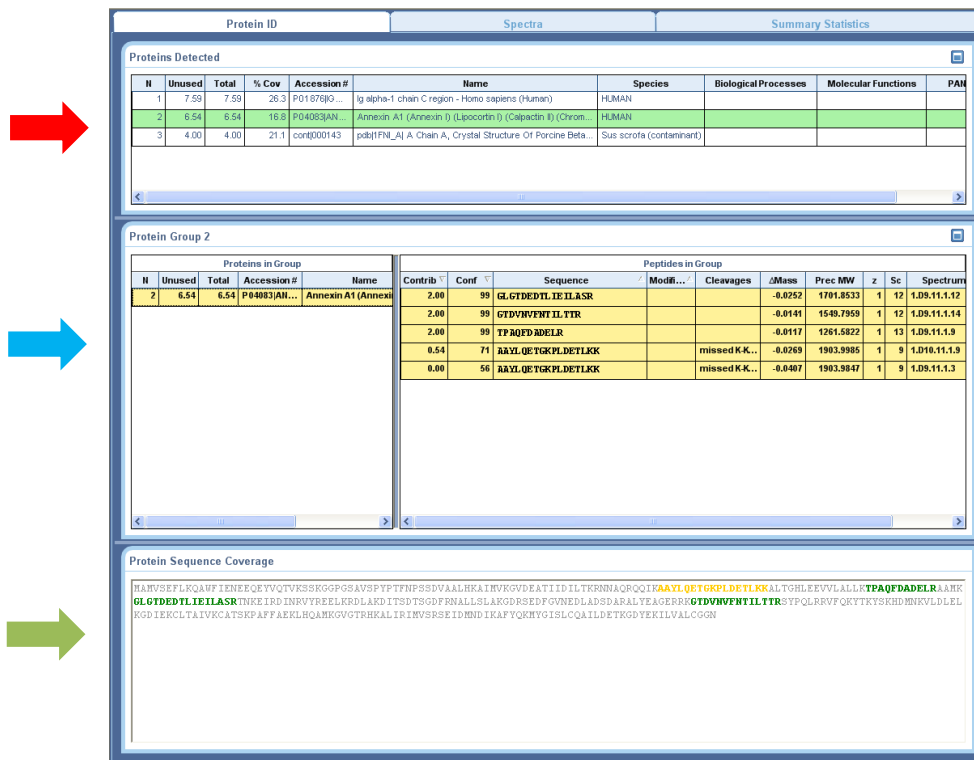


Figura 17. Identificación de Anexina A1 en el punto 17 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar

Punto 19

En este punto se identificaron 7 péptidos perteneciente a la secuencia de proteína (Figura 16, señalado con flecha verde). Cuatro de los péptidos tuvieron una confianza mayor a 95 (secuencia resaltada en verde) y los otros tres péptidos tuvieron una confianza menor a 50 (secuencia resaltada en rojo).

En la sección media señalada con la flecha azul se muestra la **evidencia de proteínas que se intersecta** donde se reporta como única proteína posible presente a la Anexina A1, ya que las secuencias peptídicas reportadas como halladas no se comparten con otras hipotéticas proteínas. Asimismo se muestra que una de las secuencias peptídicas (MYGLSLCQAILDETK) es predicha sufriendo como modificación oxidación en la primera metionina (M) y carbamidometilación en la séptima cisteína (C).

En la sección superior señalada con flecha roja se muestran las proteínas que pueden ser reportadas como presentes en el punto además de la proteína mencionada, por lo tanto, se identificó junto con Anexina A1 a Anhidrasa carbónica 6, a Ig alfa cadena-1 de la región C, así como a un contaminante.

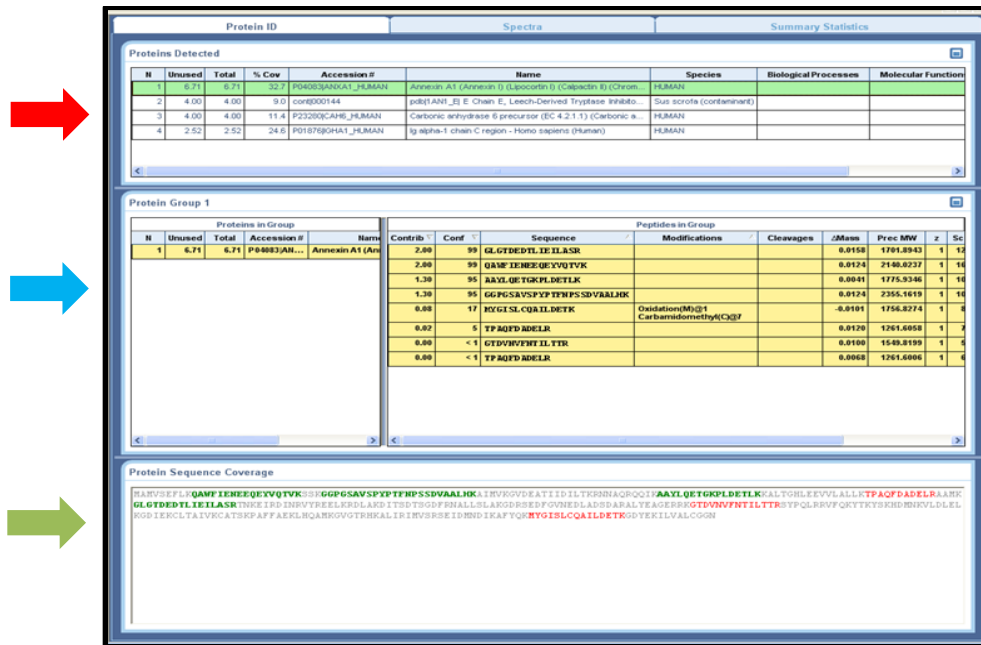


Figura 18. Identificación de Anexina A1 en el punto 19 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.

Calicreína-1

Esta proteína fue identificada en el punto 8 (**Figura 19**) (**Tabla 8**).

Se identificaron 4 péptidos pertenecientes a la secuencia de proteína (Figura 17, señalado con flecha verde). Dos de los péptidos tuvieron una confianza mayor a 95 (secuencia resaltada en verde); uno de los péptidos tuvo una confianza entre 50 y 95 (secuencia resaltada en amarillo) y un péptido más tuvo una confianza menor a 50 (secuencia resaltada en amarillo).

En la sección media señalada con la flecha azul se muestra la **evidencia de proteínas que se intersecta** donde se muestra que otras proteínas por compartir homología con las proteínas presentadas también podrían ser hipotéticamente reportadas, sin embargo en este caso particular no se muestra alguna otra proteína hipotética. Asimismo se muestran que modificaciones en las secuencias peptídicas presentadas han sido predichas para poder inferir su presencia de las mismas:

En la secuencia VTDFMLCVGHLEGG la séptima cisteína se predice sufre de carbamidometilación; en la secuencia QADEDYSHDLMLLR se predice que la onceava metionina ha sido oxidada; en el péptido CISDNYQLWLGR la primera cisteína ha sufrido carbamidometilación; en la secuencia QADEDYSHDLMLLR el primer ácido glutámico es sustituido por una glutamina y la onceava metionina se encuentra metilada. En la secuencia QWVLTAHCISDNYQLWLGR la novena cisteína esta carbamidometilada, finalmente en la secuencia peptídica VTDFMLCVGHLEGGK la quinta metionina ha sufrido oxidación y la séptima cisteína ha sufrido carbamidometilación.

En la sección superior señalada con flecha roja se muestran las proteínas que pueden ser reportadas como presentes en el punto además de la proteína mencionada, por lo tanto, se identificó junto con Calicreína-1, a Calreticulina y un contaminante.

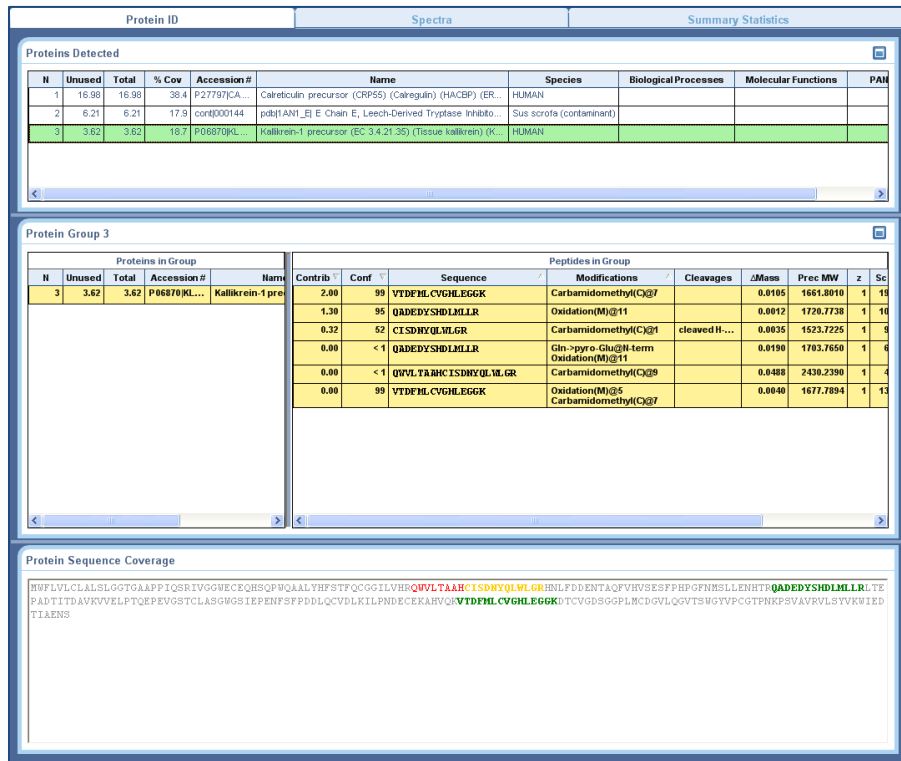


Figura 19. Identificación de Caliceína-1 en el punto 8 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.

Calreticulina

Esta proteína fue identificada en dos puntos: En el punto 7 y 8 (Figura 20) (Figura 21) (Tabla 8).

Punto 7

Se identificaron 4 péptidos pertenecientes a la secuencia de proteína (Figura 18, señalado con flecha verde). Tres de los péptidos tuvieron una confianza mayor a 95 (secuencia resaltada en verde) y uno de los péptidos tuvo una confianza entre el 50 y 95 (secuencia resaltada en amarillo).

En la sección media señalada con la flecha azul se muestra la **evidencia de proteínas que se intersecta** donde se muestra que otras proteínas por compartir homología con las proteínas presentadas también podrían ser hipotéticamente reportadas, sin embargo en este caso particular no se muestra alguna otra proteína hipotética. Asimismo se muestran que modificaciones en las secuencias peptídicas presentadas han sido predichas para poder inferir su presencia. En este caso se muestra que una cisteína de la secuencia peptídica HEQNIDCGGGYVK (sufrió de carbamidometilación).

En la sección superior señalada con flecha roja se muestran las proteínas que pueden ser reportadas como presentes en el punto además de la proteína mencionada, por lo tanto, se identificó junto como única proteína presente en este punto a calreticulina.

The screenshot displays a software interface with three main sections:

- Proteins Detected:** A table with columns: N, Unused, Total, % Cov, Accession #, Name, Species, Biological Processes, Molecular Functions, and PANTHER ID. A red arrow points to this section.
- Protein Group 1:** A table with two sub-sections: 'Proteins in Group' and 'Peptides in Group'. The 'Peptides in Group' table has columns: Contrib, Conf, Sequence, Modifications, Cleavages, ΔMass, Prec MW, z, and Sc. A blue arrow points to this section.
- Protein Sequence Coverage:** A text area showing a protein sequence with highlighted regions. A green arrow points to this section.

Figura 20. Identificación de Calreticulina en el punto 8 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.

Punto 8

Se identificaron 8 péptidos pertenecientes a la secuencia de proteína (Figura 19, señalado con flecha verde). Cinco de los péptidos tuvieron una confianza mayor a 95 (secuencia resaltada en verde); uno de los péptidos tuvo una confianza entre el 50 y 95 (secuencia resaltada en amarillo) y finalmente un péptido más tuvo una confianza menor a 50.

En la sección media señalada con la flecha azul se muestra la **evidencia de proteínas que se interseca** donde se muestra que otras proteínas por compartir homología con las proteínas presentadas también podrían ser hipotéticamente reportadas, sin embargo en este caso particular no se muestra alguna otra proteína hipotética. Asimismo se muestran que modificaciones en las secuencias peptídicas presentadas han sido predichas para poder inferir su presencia.

En la sección superior señalada con flecha roja se muestran las proteínas que pueden ser reportadas como presentes en el punto además de la proteína mencionada, por lo tanto, se identificó junto como además de calreticulina, a calicreína-1 y un contaminante presente en el punto.

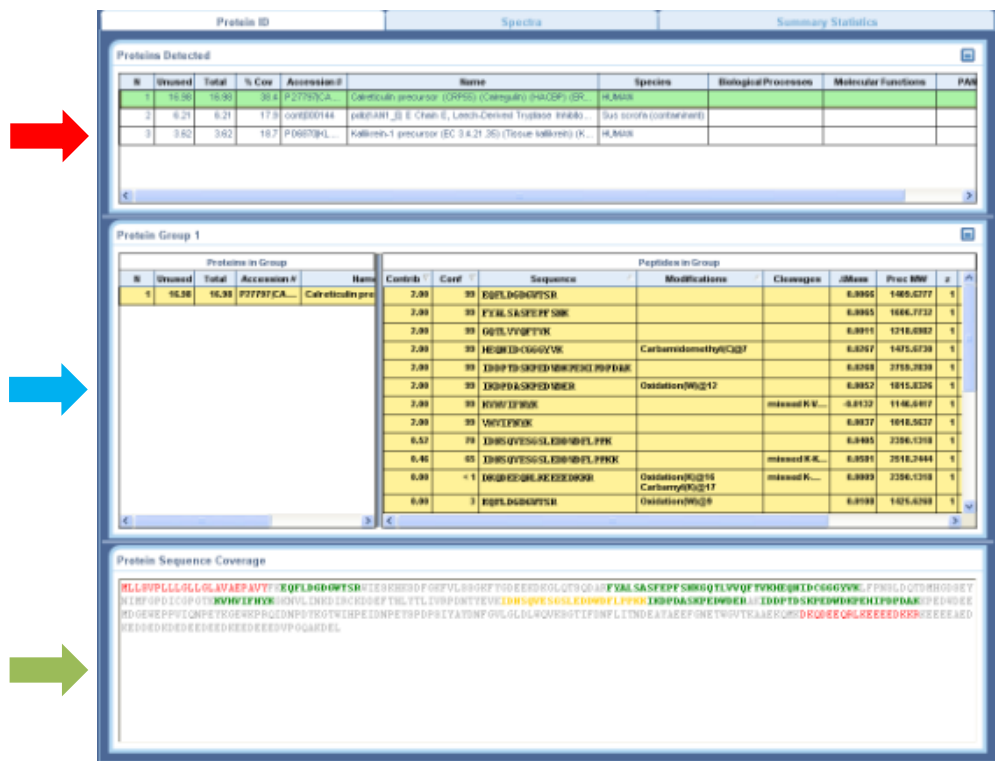


Figura 21. Identificación de Calreticulina en el punto 9 del gel bidimensional correspondiente a los sujetos con adenocarcinoma pulmonar.

Una vez identificada las proteínas se realizó la anotación en la imagen correspondiente del gel (Figura 22) para verificar si la proteínas identificadas correspondían al peso y punto isoeléctrico hipotético para cada una de ellas, verificando la solidez de las identificaciones.

Fumadores con adenocarcinoma pulmonar

pH NL 3-10



Figura 22. Proteínas identificadas en gel bidimensional de mezcla de sujetos fumadores con adenocarcinoma pulmonar que fueron incluidos como parte de la fase descubrimiento de este estudio.

El gel tiene como características que la primera dimensión se corrió en tira de gradiente pH 3-10 NL (no lineal) y en una segunda dimensión en PAGE con una resolución de peso molecular entre 5 – 225 kDa (concentración 13.5 % acrilamida y 1 mm de grosor). Una vez identificados los péptidos y determinada la proteína a la que correspondían se realizó la correspondiente anotación en la imagen del gel (cuadro rosa). En el caso de varios puntos no se logró determinar la presencia de proteína alguna o se identificó presencia de contaminantes. Las proteínas identificadas en cada uno de los puntos se detallan en la tabla 7.

Fase de Validación

Validación de proteínas a través de experimentos ELISPOT y ELISA

Utilizando muestras de 4 sujetos distintos distribuidos entre las categorías establecidas en los criterios de inclusión se realizaron experimentos ELISPOT en membranas de PVDF para determinar si utilizando tres anticuerpos comerciales se obtenía detección de las proteínas de interés en muestras de saliva. Se utilizaron anticuerpos anti- Anexina-A1, anti- Calicreína-1 y anti-Calreticulina. Una vez realizado el experimento (descrito en materiales y métodos) se escaneron las membranas en el fotodocumentador *Gel Doc XR System, BioRad*. (Figura 23).

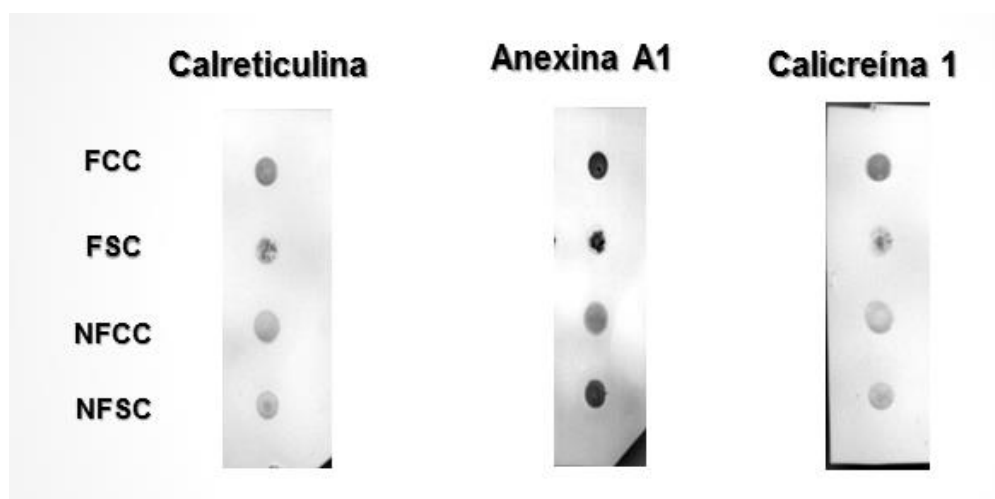


Figura 23. Ensayos ELISPOT para valorar la presencia de las muestras en 4 sujetos clasificados entre las distintas categorías que se utilizaron en validación independiente.

Realizamos un ensayo de inmunoabsorción para determinar si los tres anticuerpos seleccionados (calreticulina, Anexina A1, Calicreína) podrían utilizarse en muestras de saliva. Para este ensayo incluimos un sujeto de cada uno de los grupos a estudiar (FCC, FSC, NFCC y NFSC). Los cuatro demostraron niveles detectables de proteínas para los tres anticuerpos por lo cual se decidió continuar con los experimentos ahora en placa ELISA para comparar la expresión de las proteínas en un grupo independiente.

Grupo independiente para validación

Para la validación de las muestras de proteínas a través de los experimentos ELISA se seleccionaron un total de 111 individuos: 32 Fumadores sin cáncer; 28 Fumadores con cáncer; 20 No fumadores sin cáncer; 31 No fumadores con cáncer. En esta fase se decidió incluir tanto hombre como mujeres. La distribución de mujeres no fue homogénea entre los grupos, representando solo el 7% de FCC, 33% FSC, 48% de NFCC y 57% de NFSC. En cuanto a la edad podemos observar que la media para el grupo de casos tanto en fumadores como no fumadores es mayor ($p < 0.001$). En el grupo de casos fumadores la media de paquetes año fue de 31.4 comparada con solo 17.6 en los controles ($p < .001$). A continuación se presentan los datos clínicos demográficos y experimentales de relevancia:

Tabla 9. Perfiles clínicos, demográficos y experimentales de los sujetos

Dato	Fumadores con cáncer	Fumadores sin cáncer	No fumadores con cáncer	No fumadores sin cáncer
Edad, años	63.6 ± 10.4	47.6 ± 9.7	60.1 ± 12.5	47.8 ± 7.3
Rango	43-79	29-74	35-82	40-67
Sexo (H/M)	28(26/2)	33(22/11)	31(16/15)	21(9/12)
Historia previa de tabaquismo	Todos	Todos		
Paquetes año	31.4±26.1	17.6±15.1		
Concentración de proteínas (mg/mL)	2.83 ± 0.59	2.27 ± 0.76	2.67 ± 0.85	2.33 ± 0.59
Distribución de frecuencia	24.78	29.20	27.43	18.58

Ensayos por ELISA

Para corroborar si las proteínas identificadas en la fase de descubrimiento tienen una expresión diferencial en un grupo independiente de casos y controles se decidió utilizar el ensayo de ELISA. Una vez cuantificadas las proteínas, se realizaron los cálculos para tomar lo correspondiente a 10 µg de proteína. Se decidieron utilizar 3 anticuerpos de casas comerciales que habían sido verificados previamente por Experimentos ELISPOT como viables para ser analizados en muestras de saliva. Una vez incubado el anticuerpo primario, se decidió utilizar el anticuerpo secundario correspondiente para cada caso y posteriormente revelar con sustrato OPD-H₂O₂. Se midió la absorbancia de las placas *reveladas* en lector de placas ELISA automatizado a 450 nm y se utilizó como control negativo para la normalización de los datos las condiciones descritas en la figura 11.

A continuación se muestran 3 imágenes representativas de placas reveladas:



Figura 24. Placas representativas de 3 anticuerpos utilizados para la fase de validación

De izquierda a derecha: Placa para la detección de Calicreína-1, Anexina A1 y Calreticulina a través de inmunoensayos (ELISA). En cuadro rojo se indica el lugar de los controles negativos de distintas condiciones e inferiormente se muestra como se detectó la presencia de las proteínas en muestras por triplicado en 2 de los 3 anticuerpos una vez revelados con OPD-H₂O₂. En el caso de calreticulina se muestra una placa representativa donde se muestra como fue la proteína de menor niveles de detección, donde solo 2 individuos expresaron niveles detectables de la proteína (se señala con flecha roja un caso particular en la placa 1).

Durante los experimentos de validación se obtuvieron como media de concentración de proteínas de todos los grupos 2.51 mg/mL y como media de absorbancia para los anticuerpos Anexina A1 se obtuvo 0.092, para Calicreína 1 0.148 y para Calreticulina 0.012 (ver **Tabla 9**).

Tabla 10. Datos estadísticos generales sobre concentración de proteínas y absorbancia de 3 anticuerpos de interés experimental

Datos	Proteínas [mg/mL]	Anexina A1	Calicreína 1	Calreticulina
Mínimo – Máximo	0.77 - 4.48	0.015 - 0.590	0.009 – 0.400	0.000 – 0.398
Media	2.519	0.092	0.148	0.012
Mediana	2.37	0.071	0.139	0.007
1er Qu. – 3er Qu.	1.970 - 3.160	0.0460 – 0.150	0.118 – 0.172	0.002 – 0.011

Desglosándolos por grupo se observó que la media y mediana de absorbancia para Anexina A1 es mayor en individuos fumadores sin cáncer, sin embargo es importante hacer notar que cuando comparamos los individuos con cáncer y sin cáncer tanto en fumadores como no fumadores la expresión de Anexina A1 esta disminuida en los casos.

En el caso de Calicreína-1 encontramos también que los niveles más altos se encuentran en pacientes fumadores sin cáncer.

La absorbancia de Calreticulina no fue detectable visualmente, sin embargo, se sometió a lectura y normalización de los datos. Al comparar los grupos encontramos que los niveles más altos se encuentran entre No fumadores sin cáncer (0.22) y Fumadores sin cáncer (0.14) (Ver **Tabla 10**)

Tabla 11. Media y Mediana de absorbancia para las tres proteínas de interés

Dato	Fumadores con cáncer	Fumadores sin cáncer	No fumadores con cáncer	No fumadores sin cáncer
Anexina A1	0.074/0.064	0.158/0.111	0.053/0.048	0.070/0.072
Calicreína 1	0.143/0.1395	0.167/0.1590	0.136/0.1390	0.142/0.1240
Calreticulina	0.008/0.008	0.014/0.007	0.008/0.007	0.022/0.000

Con el fin de determinar si las variables de estudio tenían una distribución normal se realizó el **Test de Shapiro Wilk** para contrastar la normalidad de los conjuntos de datos. Este test parte de plantear como hipótesis nula que una muestra $X_1..X_n$ proviene de una población normalmente distribuida. Una vez realizada la prueba se demostró que los datos no tienen una distribución normal por lo que se decidió utilizar pruebas no paramétricas para la comparación entre los grupos.

Tabla 12. Test de Shapiro Wilk

Proteína	W	p-valor
Anexina A1	0.604	5.533e-16
Calicreína-1	0.942	9.927e-05
Calreticulina	0.217	2.2e-16

Para la comparación de los cuatro grupos, se utilizó como prueba no paramétrica el **Test de Kruskal Wallis**. Esta prueba determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada una de las proteínas seleccionadas.

Tabla 13. Test de Kruskal Wallis para las 3 proteínas de interés

Dato	Anexina A1	Calicreína-1	Calreticulina
Chi Cuadrada	28.4106	7.1734	8.8056
Df	3	3	3
p-valor	2.978e-06	0.06657	0.0319

Una vez determinada la existencia de diferencias entre las medias se realizó **Prueba de Tukey** para determinar cuáles son los grupos que difieren. En el caso de Anexina A1 el grupo que difiere entre todos es el de Fumadores sin cáncer (con FCC $p= 0.017$; con NFSC $p= 0.017$; con NFCC $p= 0.009$). No se encontraron diferencias entre los FCC y NFSC; FCC y NFCC; NFSC y NFCC.

Tabla 14. Prueba de Tukey para Anexina A1

Clasificación	Clasificación	Diferencia media	Error estándar	Significancia
FSC	FCC	0.077	0.025	0.017
	NFSC	0.077	0.025	0.017
	NFCC	0.085	0.026	0.009
FCC	FSC	-0.077	0.025	0.017
	NFSC	0.0003	0.028	1.000
	NFCC	0.007	0.028	0.993
NFSC	FSC	-0.077	0.025	0.017
	FCC	-0.0003	0.028	1.000
	NFCC	0.007	0.028	0.994
NFCC	FSC	-0.085	0.026	0.009
	FCC	-0.007	0.028	0.993
	NFSC	-0.007	0.028	0.994

En Calicreína-1 la prueba de Tukey demostró que los grupos que son diferentes de manera significativa entre sí son los FSC y NFSC ($p= 0.035$). El resto de comparaciones no mostró expresión diferencial.

Tabla 15. Prueba de Tukey para Calicreína 1

Clasificación	Clasificación	Diferencia media	Error estándar	Significancia
FSC	FCC	0.018	0.014	0.617
	NFSC	0.041	0.014	0.035
	NFCC	0.030	0.015	0.190
FCC	FSC	-0.081	0.014	0.617
	NFSC	0.023	0.016	0.499
	NFCC	0.012	0.016	0.877
NFSC	FSC	-0.041	0.014	0.035
	FCC	-0.023	0.016	0.499
	NFCC	-0.010	0.016	0.919
NFCC	FSC	-0.030	0.015	0.190
	FCC	-0.012	0.016	0.877
	NFSC	0.010	0.016	0.919

En el caso de Calreticulina la prueba determinó que podía distinguirse significativamente los NFSC de los demás grupos: NFSC-FSC $p= 0.003$; NFSC-FCC $p= 0.001$; NFSC- NFCC $p= 0.001$. Finalmente Calreticulina tuvo una expresión mínima en los ensayos por ELISA con valores apenas detectables. De todos los sujetos solamente dos tuvieron una expresión significativa de esta proteínas (Un fumador sin cáncer y un no fumador sin cáncer; ver figura de placas y gráfica de puntos). Sin embargo, se decidió realizar las pruebas estadísticas correspondientes y el grupo no fumadores sin cáncer tuvo una expresión diferencial que lo distingue con significancia de todos los demás grupos.

Tabla 16. Prueba de Tukey para Calreticulina

Clasificación	Clasificación	Diferencia media	Error estándar	Significancia
FSC	FCC	-0.001	0.002	0.945
	NFSC	0.008	0.002	0.003
	NFCC	-0.001	0.002	0.873
FCC	FSC	0.001	0.002	0.945
	NFSC	0.009	0.002	0.001
	NFCC	-0.0005	0.002	0.996
NFSC	FSC	-0.008	0.002	0.003
	FCC	-0.009	0.002	0.001
	NFCC	-0.010	0.002	0.001
NFCC	FSC	0.001	0.002	0.873
	FCC	0.0005	0.002	0.996
	NFSC	0.010	0.002	0.001

Anexina A1

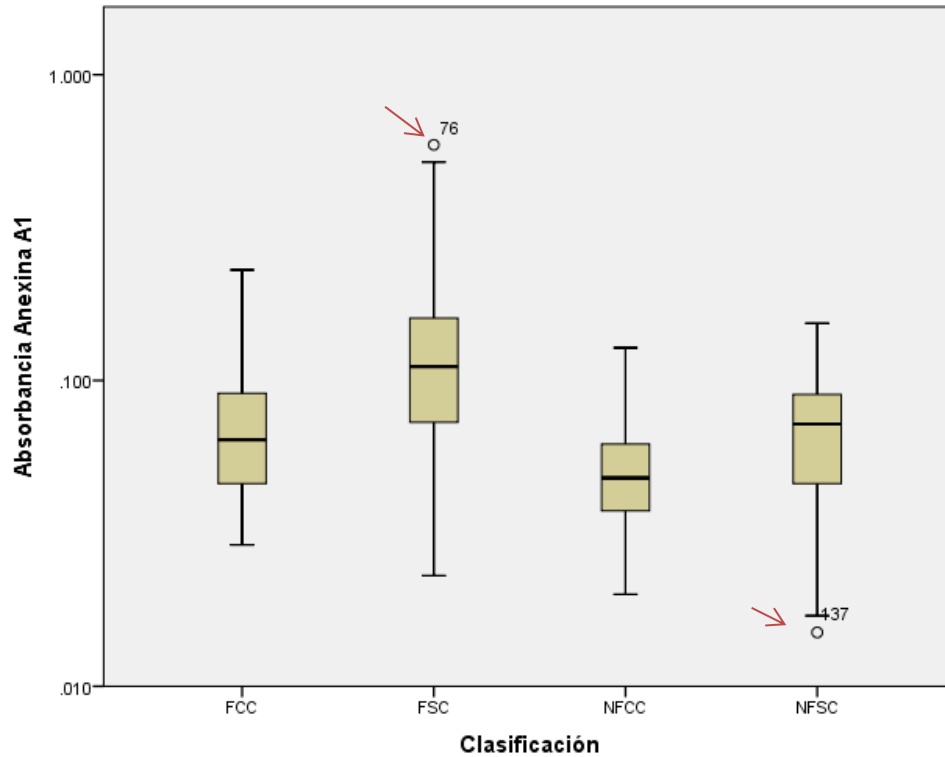


Figura 25. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Anexina -A1.

FCC: Mediana: 0.074, Valor máximo: 0.230, Valor mínimo: 0.029 **FSC:** Mediana: 0.158, Valor máximo: 0.590, Valor mínimo: 0.023 **NFCC:** Mediana: 0.053, Valor máximo: 0.128, Valor mínimo: 0.020 **NFSC:** Mediana: 0.070, Valor máximo: 0.154, Valor mínimo: 0.014. 2 valores atípicos: Sujeto 76 de FSC y sujeto 137 de NFSC.

Los valores dentro de los distintos grupos muestran una amplia distribución, siendo el de mayor amplitud el grupo perteneciente a los fumadores sin cáncer.

La prueba estadística Shapiro Wilk demostró que los datos tienen una distribución no normal y el Test de Kruskal Wallis mostró que un grupo era significativamente diferente de los demás. Posteriormente, aplicando la prueba de Tukey se determinó que el grupo que se distinguía de los demás era los Fumadores sin cáncer. En el diagrama se muestra que existen 2 valores atípicos dentro de los distintos grupos, uno en el grupo de fumadores sin cáncer y otro en el de no fumadores sin cáncer (Se señalan con flecha roja).

Caliceína-1

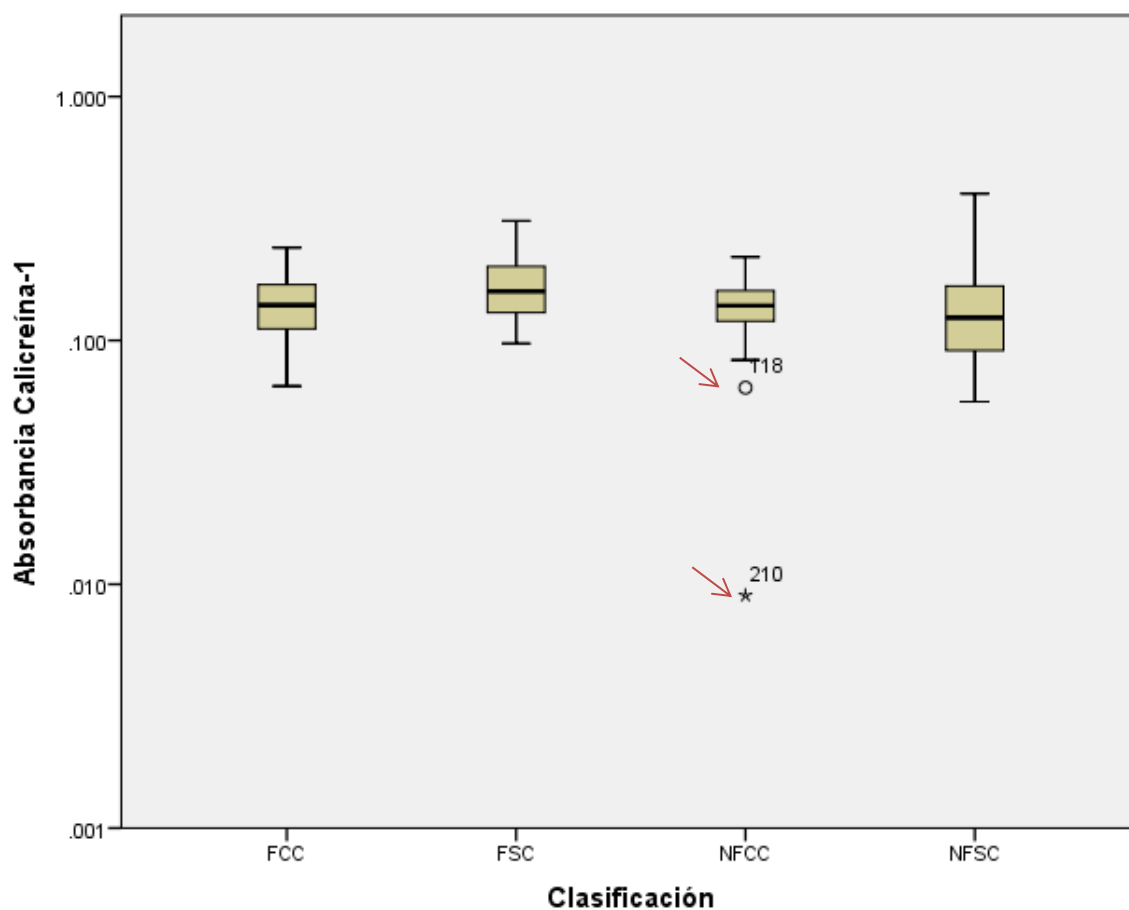


Figura 26. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Caliceína-1.

FCC: Mediana: 0.143 , Valor máximo: 0.240, Valor mínimo: 0.065 **FSC:** Mediana: 0.167, Valor máximo: 0.309, Valor mínimo: 0.097 **NFCC:** Mediana: 0.053, Valor máximo: 0.220, Valor mínimo: 0.009 **NFSC:** Mediana: 0.142, Valor máximo: 0.400, Valor mínimo: 0.056. 2 valores 118 y 210.

Los valores dentro de los distintos grupos no muestran una amplia distribución, siendo el que presenta mayor amplitud en grupo perteneciente a los no fumadores sin cáncer.

La prueba estadística Shapiro Wilk demostró que los datos tienen una distribución no normal y el Test de Kruskal Wallis mostró que existe expresión diferencial sólo entre dos grupos: Los no fumadores sin cáncer de los fumadores sin cáncer (p 0.035). El grupo de no fumadores con cáncer mostraron dos valores atípicos. (Se señalan con flecha roja).

Calreticulina

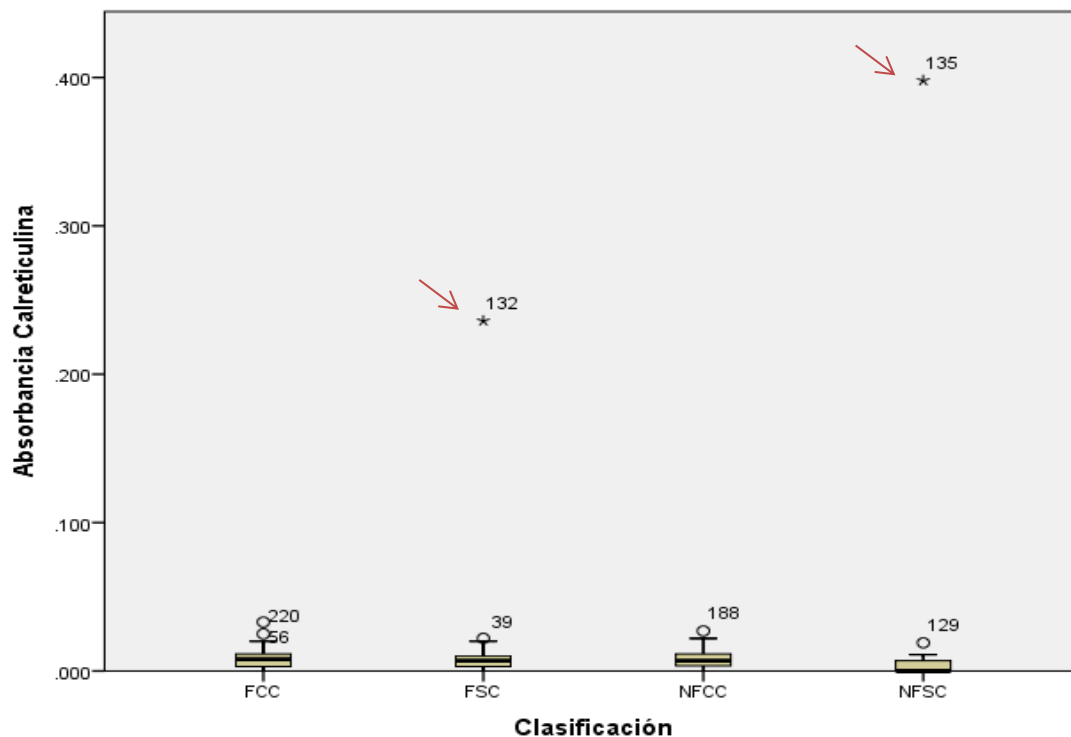


Figura 27. Diagramas de caja donde se visualizan los datos correspondientes al ensayo ELISA para Calreticulina.

FCC: Mediana: 0.008 , Valor máximo: 0.033 , Valor mínimo: 0.000 **FSC:** Mediana: 0.014, Valor máximo: 0.236, Valor mínimo: 0.000 **NFCC:** Mediana: 0.008, Valor máximo: 0.027, Valor mínimo: 0.000 **NFSC:** Mediana: 0.022, Valor máximo: 0.398, Valor mínimo: 0.00. No se encontraron niveles de expresión de este anticuerpo a través del ensayo, a excepción de dos muestras que se incluyen como valores atípicos: Sujeto 132 y 135.

A pesar de no mostrar expresión esta proteína (a excepción de dos casos) se decidió realizar estadística y gráficos para mostrar visualmente la nula expresión de esta proteína. A pesar de que se muestran varios valores atípicos estos tienen valores despreciables de expresión estando prácticamente situados en valores cercanos al cero. La excepción fueron 2 valores atípicos, uno expresado dentro de los fumadores sin cáncer (sujeto 132) y otro dentro de los no fumadores sin cáncer (sujeto 135), los dos sujetos se indican con flecha roja.

DISCUSION

En el presente estudio hemos abordado el concepto de estudiar al proteoma salival como un medio que permita discriminar a través de la expresión proteica grupos de sujetos con y sin cáncer pulmonar, por lo que utilizamos una estrategia basada en la realización de geles bidimensionales, identificación por espectrometría de masas y posterior validación a través de inmunoensayos.

Parte crítica de este tipo de estudios es la colección, procesamiento y almacenamiento de las muestras biológicas (49) y en el presente trabajo se utilizaron dos protocolos (figura 10): El primero involucraba varios pasos de limpieza de la muestra y fue utilizado con las muestras de la fase descubrimiento. A pesar de obtener proteínas sin agentes interferentes, el rendimiento total era bajo y variable de muestra a muestra (ver tabla 5, 6 y 7) por lo que se propuso posteriormente mejorar el protocolo de extracción y se sometió a estandarización otro protocolo propuesto previamente en la literatura(47) (50). Los resultados de evaluación de este segundo protocolo mostraron eficacia en cuanto a obtención de proteínas con concentraciones regulares y adecuada integridad (figura 12), por lo tanto se estableció como el protocolo definitivo que fue el utilizado en la fase de validación y con el que actualmente se trabaja las muestras en el laboratorio (Anexo 3).

En la fase descubrimiento se utilizaron seis sujetos fumadores con adenocarcinoma pulmonar y seis sujetos fumadores sin adenocarcinoma pulmonar que fueron agrupados en una sola muestra y sometidos a electroforesis mediante geles bidimensionales para comparar los perfiles de expresión (figura 13, 14, 15). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada por diversos autores incluyendo estudios realizados de proteoma salival (44). Los geles fueron realizados por triplicado para demostrar la reproducibilidad técnica de los patrones generados. Las características sociodemográficas de los sujetos se muestran en la tabla 7.

De los puntos identificados se seleccionaron 20 presentes solo en los geles de adenocarcinoma pulmonar y que además eran viables para ser cortados. Posterior a la escisión se evaluaron por espectrometría de masas para lograr la identificación de las proteínas incluidas. Los análisis por MS y bioinformática (tabla 8) condujeron a la identificación de 39 proteínas en total, de las cuales 15 eran no redundantes. Se realizó una búsqueda en la literatura acerca de posible asociación o correlación con la enfermedad y se encontró que 3 de estas proteínas tenían reporte de potencial biomarcador ya sea en tejido, suero o saliva para CP (tabla 3 y 4) por lo que nos decidimos enfocar en estos candidatos para los siguientes análisis. En particular estos 3 candidatos son: Calicreína-1, Calreticulina y Anexina A1. Los detalles de su identificación bioinformática se muestran en las figuras 17,18, 19, 20, 21, 22.

Un suceso de notar es que los geles correspondientes a los casos siempre mostraban mayor intensidad en los puntos de las principales proteínas presentes y sus isoformas, principalmente amilasa salival, que se encuentra en el área de 60 kDa (ver figura 4 y 5) lo que hizo

pensar que quizás era debido a errores técnicos o a las múltiples limpiezas hechas con las columnas. Sin embargo, al utilizar el nuevo protocolo estandarizado que involucraba menor limpieza de muestra y utilizando muestras diferentes (un FCC y un FSC) se volvió a presentar este fenómeno de mayor intensidad de los spots del área de 60 kDa en los casos a diferencia de los controles (figura 16, señalado en círculo rojo).

En la validación se incluyeron un total de 111 sujetos para medir la expresión de las tres proteínas mencionadas a través de inmunoensayos ELISA. Las características sociodemográficas de los sujetos y distribución dentro de los distintos grupos se muestran en la tabla 9. Existieron diferencias en cuanto a promedio de edad entre los casos y controles siendo mayor el promedio en los primeros ($p=0.05$), probablemente esto se debió a que la donación de la muestra es cuando los sujetos han sido diagnosticados con la enfermedad y generalmente esto sucede en personas mayores de 50 años, después de una larga progresión de la enfermedad pues los diagnósticos en México suelen ser tardíos. Todos los sujetos tenían estadificación avanzada (tabla 9).

Una vez realizados los ensayos ELISA mediante un protocolo establecido (ver materiales y métodos, anexo 4) se obtuvieron las mediciones por absorbancia normalizando los valores con controles negativos. En la tabla 10 se muestran los valores generales de concentración de proteínas total, así como de los absorbancia de las mediciones para los 3 anticuerpos dirigidos contra Anexina A1, Calicreína-1 y calreticulina. De estos valores en general se observó que de Calicreína-1 se obtuvo mayor absorbancia comparando tanto las medias y medianas en relación a los otros dos anticuerpos.

A continuación se realizaron las pruebas estadísticas para valorar la diferencia entre la expresión de las proteínas en los distintos grupos (FCC, FSC, NFCC y NFSC). En la tabla 11 se muestran los datos de media y mediana de absorbancia para estos tres anticuerpos dirigidos contra las proteínas. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk (tabla 12) para demostrar la normalidad de los datos, estos mostraron una distribución no normal por lo que se procedió a aplicar el test de Kruskal Wallis (tabla 13). Una vez que se demostró existía diferencia entre los distintos grupos se aplicó la prueba de Tukey (tabla 14, 15, 16) como prueba post-hoc para demostrar que grupos era significativos y diferenciales de los demás. Los datos se presentaron gráficamente en diagramas de cajas mostrados en las figuras 25, 26 y 27.

Anexina A1 es una proteína de 37kDa que pertenece a la superfamilia de las anexinas y comparten 40-60% de homología tanto estructural como biológica. Están involucradas en vías inflamatorias, proliferación celular y regulación de muerte celular asimismo en carcinogénesis. La región N-terminal de esta proteína (49 residuos) es la región reguladora que contiene sitios blancos de fosforilación y proteólisis (51). Se sabe que en sujetos con cáncer de pulmón genera auto-anticuerpos circulantes en sangre (44). Al realizar los ensayos ELISA Anexina A1 mostró una expresión diferencial ($p=0.002$) entre los distintos grupos (tabla 13). Al aplicar la prueba post hoc mostró que el grupo que se distinguía de los demás era el de FSC. FSC-FCC $p: 0.017$; FSC-NFSC $p:0.017$; FSC-NFCC $p:0.009$. La expresión obtenida en los FSC fue opuesta a lo sugerido por los experimentos proteómicos pues se encontró más elevada en el grupo de fumadores sin cáncer,

distinguiéndolo de todos los demás grupos. En el estudio realizado por Wong y cols. (44), utilizando muestras de saliva para distinguir entre sujetos con y sin cáncer pulmonar también identificaron a Anexina A1 como potencial biomarcador, sin embargo fallaron al intentar validarlo mediante técnica de Western Blot, llegando a la conclusión en su caso que no alcanzaban niveles detectables.

Calreticulina es una proteína chaperona de unión a calcio en el retículo endoplásmico; previamente ya ha sido hipotetizada como biomarcador diagnóstico y predictivo (sérico) para cáncer pulmonar(52). Esta proteína prácticamente no ha sido estudiada en el proteoma salival y por lo tanto no se ha elucidado su origen y su función en la cavidad bucal, aunque se sugiere pudiera estar asociada a respuestas inflamatorias, debido al consumo de tabaco (53). Al realizar los ensayos mostró una expresión muy baja, siendo diferencial para el grupo de NFSC distinguiéndolo de todos los demás grupos NFSC-FSC $p=0.003$; NFSC-FCC $p=0.001$; NFSC-NFCC $p=0.001$. Aunque es una proteína presente en saliva, probablemente está en concentraciones por debajo del límite de detección de un inmunoensayo. Como excepción a esta última sentencia, de todos los casos analizados solamente 2 sujetos mostraron una expresión muy alta de la proteína. Estos sujetos eran controles, siendo un hombre y una mujer, fumador y no fumador respectivamente. Al revisar las historias clínicas correspondientes, la única condición que compartían estos dos sujetos es el diagnóstico de hipertensión arterial sistémica no controlada. A pesar de estar limitado a dos sujetos, este hallazgo podría sugerir nuevas hipótesis acerca de la expresión como biomarcador de calreticulina en la cavidad bucal.

Calicreína-1 pertenece a una familia de proteasas hipotetizadas como biomarcadores para cáncer. Estas proteínas tienen su origen en 15 genes diferentes, que dan lugar a más de 80 transcritos (54). En saliva humana también han sido estudiadas en relación al desarrollo de distintas enfermedades y condiciones como potenciales biomarcadores diagnóstico y pronóstico de tumores remotos a cavidad bucal (55). En particular, calicreína-1 es una serina-proteasa parecida a tripsina con preferencia por la arginina en posición P1. Se ha reportado que puede ser inhibida por PMSF, benzamidina, leupeptina, calistatina, inhibidor de proteína C y aprotinina (56). Se sabe que calicreína es una proteína variable y sometida de manera extensa a modificaciones post-traduccionales lo que deja a lugar a masa de <20, 45, 60, 90 >200 kDa (56). Al realizar las pruebas estadísticas de los datos obtenidos en los inmunoensayos se mostró expresión diferencial ($p= 0.06$) cercana a la significancia. La prueba post hoc arrojó que los únicos grupos que podían distinguirse entre sí con una significancia de $p=0.03$ eran los FSC de los NFSC.

Todos estos datos sugieren que la falta de congruencia entre los hallazgos en la fase descubrimiento y validación podrían deberse a diversas posibilidades como:

*Diferencia en el tratamiento dado a las muestras al momento de realizar la extracción y resuspensión de muestras en la fase descubrimiento y validación.

*La posibilidad de que al realizar los geles bidimensionales y la identificación por espectrometría de masas probablemente se identificaron péptidos e isoformas de las distintas proteínas identificadas pues se ha mostrado que en la saliva persisten este tipo de proteínas y arreglos

postraduccionales (57) ya sea proteólisis, glicosilación y fosforilación entre otros y quizás debido a esto se debió la falta de congruencia y expresión al momento de intentar realizar la posterior validación en los inmunoensayos.

*Se establece que probablemente una de las razones por las cuales no se ha logrado la validación clínica esperada de biomarcadores proteicos para cáncer (entre otras enfermedades) es la existencia de una variedad de mecanismos que convierten al producto génico en una variedad de formas proteicas, las denominadas isoformas. La implicación de estas isoformas en esta falla por la búsqueda de biomarcadores es raramente considerada, pero fácilmente entendible: Las variaciones que afectan ciertas isoformas proteicas pueden ser enmascaradas cuando se utilizan métodos de detección para medir la expresión de las proteínas, cuestión evidente en el caso de técnicas inmunológicas, como ELISA, basada en el uso de anticuerpos que generalmente no pueden distinguir entre las isoformas, a menos que hayan sido específicamente generados los anticuerpos/ensayos para detectar dicha modificación. (54)

*Otra posibilidad sobre la falta de congruencia en los hallazgos de la fase descubrimiento y validación es el hecho de haber utilizados mezcla de los sujetos por grupos al realizar los geles bidimensionales, puesto que una duda persistente es sobre la conveniencia de hacer esta técnica. La cual una estrategia viable cuando aspectos como la poca disponibilidad de muestra se presentan. Sin embargo, cuando se realiza mezcla se pierde información acerca de la variación biológica y esto es importante tomando en cuenta que existe variación biológica inherente y que debe ser tomada en cuenta como un factor importante para hacer conclusiones estadísticas sólidas. Para hacer conclusiones estadísticas al realizar mezclas es necesario utilizar métodos adicionales para validar los hallazgos(58), cuestión que se realizó en el presente estudio, sin embargo, los datos encontrados entre ambas fases pueden sugerir que los valores de las proteínas de interés fluctúan en rangos muy amplios de sujeto a sujeto y por esto no hubo congruencia en los datos entre las dos fases.

El laboratorio de Wong reportó (44) la validación 3 proteínas presentes en saliva como potenciales marcadores para cáncer pulmonar (Haptoglobina, Calprotectina, Zinc-alfa-2 Glicoproteína) con una sensibilidad del 85%, especificidad del 92.3% y área bajo la curva de 0.90. Utilizaron una estrategia basada en geles bidimensionales y posterior validación con inmunoensayos. A diferencia de nosotros su técnica es mucho más sensible para la detección de proteínas en geles bidimensionales pues utiliza marcaje con fluorescencia que detecta niveles más bajos de proteína que las tinciones comúnmente utilizadas. Además, su mezcla de muestras en la fase descubrimiento no se suscribía a un solo tipo de cáncer pulmonar sino a diferentes subtipos dentro de todo el espectro de esta enfermedad así como tampoco utilizaban criterios basados en el status fumador, ni sexo o edad. Estas limitaciones podrían representar obstáculos al momento de validar en cohortes mucho más grandes como los mismos autores reconocen.

Como perspectivas para mejorar la detección de posibles biomarcadores actualmente se están estableciendo protocolos para eliminar la proteína más abundante de saliva que es la amilasa-salival. Esto con el objetivo de aumentar el rendimiento y concentración de las proteínas

menos abundantes y que podrían ser evaluadas con mayores niveles de detección al realizar inmunoensayos. También se ha decidido realizar una nueva fase de descubrimiento utilizando la misma técnica de geles bidimensionales que utilizaron en el estudio de Wong (2D-DIGE), pues ha demostrado ser una técnica viable para la evaluación de proteoma salival global en búsqueda de biomarcadores para enfermedades remotas de cavidad bucal, pero hemos decidido no utilizar la técnica basada en la agrupación de muestras para evitar todas las consideraciones y limitaciones que se enfrentan al realizar este abordaje.

CONCLUSIONES

El presente trabajo aborda conceptos novedosos acerca de estudiar la saliva como medio diagnóstico para tumores distantes de cavidad bucal, incluyendo cáncer de pulmón, pues hasta el momento sólo dos grupos en distintas partes del mundo han estudiado a la saliva como medio diagnóstico de este mal; el lograr identificar potenciales biomarcadores en saliva a pesar de presentar atractivas ventajas también representa grandes retos desde la estandarización de un protocolo de colección, hasta un posterior ensayo de validación. Como parte del presente proyecto se lograron grandes avances acerca de la viabilidad de montar un proyecto de esta envergadura pues se lograron estandarizar los protocolos para las adecuadas técnicas y manejos de un fluido tan complejo y dinámico, como lo es la saliva. Todos los datos y resultados obtenidos sugieren que es factible continuar indagando sobre el potencial de la saliva como medio para detectar cáncer de pulmón, sin embargo, es necesario tomar en cuenta estudiar a las proteínas de interés en una forma más profunda evaluando si el potencial biomarcador radica en una isoforma o modificación post-traducciona l y por lo tanto sería necesario estudiar de lo global a lo particular una vez encontrados los mismos.

Como conclusión afirmamos:

Se han logrado la estandarización y establecido un protocolo para el estudio de proteínas obtenidas a través del complejo biofluido salival, entre ellos para extracción y resuspensión, así como para inmunoensayos como ELISA.

Se lograron identificar proteínas presentes en el grupo de casos que tenían una expresión única o diferencial al realizar una estrategia basada en realización de mezclas, posteriormente geles bidimensionales y espectrometría de masas. En esta primera etapa se compararon solamente dos grupo (Hombres fumadores con cáncer vs. Hombres fumadores sin cáncer)

A pesar de encontrar expresiones diferenciales no se lograron validar los posibles biomarcadores a través de inmunoensayos en un grupo independiente de pacientes que incluía sujetos clasificados en 2 categorías más que las utilizadas en la fase de descubrimiento. (Hombres y mujeres: Fumadores con y sin cáncer; No fumadores con y sin cáncer).

BIBLIOGRAFIA

1. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *The New England journal of medicine*. 2011;365(5):395-409. - 2011/07/01.
2. Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral diseases*. 2002;8(1):3-11. - 2002/04/09.
3. Wong D. *Salivary diagnostics*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2008. xviii, 301 p. p.
4. Thongboonkerd V. *Proteomics of human body fluids : principles, methods, and applications*. Totowa, N.J.: Humana Press; 2007. xiii, 533 p. p.
5. Unknow. *Glándulas salivales*. MEGAMEDICINA.
6. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(4):781-91. - 2013/10/05.
7. Griffin TJ. The proteome of human saliva. *SPIE Defense, Security, and Sensing* 2013;8723:87230-A.
8. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral diseases*. 2002;8(2):69-76. - 2002/05/07.
9. Castagnola M, Cabras T, Vitali A, Sanna MT, Messina I. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in biotechnology*. 2011;29(8):409-18. - 2011/05/31.
10. Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boontheung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clinical applications*. 2009;3(1):116-34. - 2009/11/10.
11. Walz A, Stuhler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G, et al. Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2006;6(5):1631-9. - 2006/01/13.
12. Castagnola M, Cabras T, Iavarone F, Fanali C, Nemolato S, Peluso G, et al. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert review of proteomics*. 2012;9(1):33-46. - 2012/02/02.
13. Ruhl S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert review of proteomics*. 2012;9(1):85-96. - 2012/02/02.
14. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clinical applications*. 2011;5(11-12):575-9. - 2011/10/01.
15. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, et al. From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Archives of oral biology*. 2012;57(7):853-64. - 2012/01/31.
16. Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Advances in dental research*. 2011;23(4):375-80. - 2011/09/16.
17. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:216-29. - 2007/04/17.
18. d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurro A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:105873. - 2013/06/06.

19. Streckfus C, Bigler L. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Advances in dental research*. 2005;18(1):17-24. - 2005/07/07.
20. Gao K, Zhou H, Zhang L, Lee JW, Zhou Q, Hu S, et al. Systemic disease-induced salivary biomarker profiles in mouse models of melanoma and non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2009;4(6):e5875. - 2009/06/12.
21. Bonne NJ, Wong DT. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome medicine*. 2012;4(10):82. - 2012/11/02.
22. Wei F, Yang J, Wong DT. Detection of exosomal biomarker by electric field-induced release and measurement (EFIRM). *Biosensors & bioelectronics*. 2013;44:115-21. - 2013/02/14.
23. Wender R, Fontham ET, Barrera E, Jr., Colditz GA, Church TR, Ettinger DS, et al. American Cancer Society lung cancer screening guidelines. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(2):107-17. - 2013/01/15.
24. Arrieta O, Guzmán de Alba E, Alba López LF, Acosta Espinosa A, Alatorre-Alexander J, Alexander Meza JF, et al. Consenso Nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas. *Rev Invest Clin*. 2013;65(Supl 1).
25. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory research*. 2003;4:12. - 2003/12/04.
26. Franco-Marina F, Villalba Caloca J, Corcho-Berdugo A. Role of active and passive smoking on lung cancer etiology in Mexico City. *Salud publica de Mexico*. 2006;48 Suppl 1:S75-82. - 2007/08/09.
27. Cooper DN. *The molecular genetics of lung cancer*. 1st ed. Berlin ; New York: Springer; 2004. xvi, 392 p. p.
28. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(13):1367-80. - 2008/09/26.
29. Pallardo Calatayud Y, Revert Ventura AJ, Castaner Gonzalez E. [Update on lung cancer staging]. *Radiologia*. 2007;49(2):83-96. - 2007/04/04. Actualizacion en la estadificacion del cancer de pulmon.
30. Heist RS, Engelman JA. SnapShot: non-small cell lung cancer. *Cancer cell*. 2012;21(3):448 e2. - 2012/03/24.
31. Tammemagi MC, Katki HA, Hocking WG, Church TR, Caporaso N, Kvale PA, et al. Selection criteria for lung-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2013;368(8):728-36. - 2013/02/22.
32. Okamura K, Takayama K, Izumi M, Harada T, Furuyama K, Nakanishi Y. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung Cancer*. 2013;80(1):45-9. - 2013/01/29.
33. Duijf PH, Benezra R. The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene*. 2013;32(40):4727-36. - 2013/01/16.
34. Varella-Garcia M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell adhesion & migration*. 2010;4(1):100-6. - 2010/02/09.
35. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(2):201-5. - 2009/04/08.
36. Farago AF, Snyder EL, Jacks T. SnapShot: Lung cancer models. *Cell*. 2012;149(1):246- e1. - 2012/04/03.
37. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6. - 2007/07/13.
38. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011;469(7329):156-7. - 2011/01/14.

39. Qiu J, Choi G, Li L, Wang H, Pitteri SJ, Pereira-Faca SR, et al. Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(31):5060-6. - 2008/09/17.
40. Taguchi A, Politi K, Pitteri SJ, Lockwood WW, Faca VM, Kelly-Spratt K, et al. Lung cancer signatures in plasma based on proteome profiling of mouse tumor models. *Cancer cell*. 2011;20(3):289-99. - 2011/09/13.
41. Liotta LA, Petricoin E. Cancer biomarkers: closer to delivering on their promise. *Cancer cell*. 2011;20(3):279-80. - 2011/09/13.
42. Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Carnero A, Paz-Ares L. Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2013. - 2013/04/23.
43. Hassanein M, Callison JC, Callaway-Lane C, Aldrich MC, Grogan EL, Massion PP. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(8):992-1006. - 2012/06/13.
44. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2012;11(2):M111 012112. - 2011/11/19.
45. Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB, et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;69(19):3341-50. - 2012/06/13.
46. Li X, Yang T, Lin J. Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of biomedical optics*. 2012;17(3):037003. - 2012/04/17.
47. Henson BS, Wong DT. Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. *Methods Mol Biol*. 2010;666:21-30. - 2010/08/19.
48. Shilov IV, Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, et al. The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6(9):1638-55. - 2007/05/30.
49. de Jong EP, van Riper SK, Koopmeiners JS, Carlis JV, Griffin TJ. Sample collection and handling considerations for peptidomic studies in whole saliva; implications for biomarker discovery. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(23-24):2284-8. - 2011/09/06.
50. Al Kawas S, Rahim ZHA, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Archives of oral biology*. 2012;57(1):1-9.
51. Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(4):968-75. - 2007/01/12.
52. Liu R, Gong J, Chen J, Li Q, Song C, Zhang J, et al. Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(6):855-64. - 2011/11/16.
53. Jessie K, Pang WW, Haji Z, Rahim A, Hashim OH. Proteomic analysis of whole human saliva detects enhanced expression of interleukin-1 receptor antagonist, thioredoxin and lipocalin-1 in cigarette smokers compared to non-smokers. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(11):4488-505. - 2010/12/15.
54. Kristoff HC. *Cancer biomarkers*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers; 2010. p. p.

55. Jenzano JW, Courts NF, Timko DA, Lundblad RL. Levels of glandular kallikrein in whole saliva obtained from patients with solid tumors remote from the oral cavity. *Journal of dental research*. 1986;65(1):67-70. - 1986/01/01.
56. Sun X, Salih E, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Activity-based mass spectrometric characterization of proteases and inhibitors in human saliva. *Proteomics Clinical applications*. 2009;3(7):810-20. - 2009/12/17.
57. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:22-50. - 2007/02/17.
58. Ludesi. Pooling samples: some considerations. 2013; Available from: <http://www.ludesi.com/blog/2009/02/pooling-samples-some-considerations/>.
59. Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR, et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. *Journal of dental research*. 2011;90(11):1325-30. - 2011/09/16.



APENDICE

Anexo 1

Hoja de Recolección de Datos

Identificación de Biomarcadores de Adenocarcinoma Pulmonar en el Proteoma de Saliva

Lugar de Recolección:

1. INCAN
2. INER
3. Hospital General
4. Clínica de Tabaquismo UNAM
5. Facultad de Posgrado Odontología
6. Otros

Fecha: _____ Hora: _____ Peso (kg): _____
Día / Mes / Año

Clasificación:

1. FSC (fumador sin cáncer)
2. FCC (fumador con cáncer)
3. NFSC (no fumador sin cáncer)
4. NFCC (no fumador con cáncer)
5. No clasificable

Preparación del paciente

Durante la última hora ha consumido y/o hecho:

Alimentos: 1 si 2 no Hora:
Bebidas: 1 si 2 no Hora:
Higiene oral: 1 si 2 no Hora:
Ultimo cigarro: 1 si 2 no Hora:

Enjuague bucal con agua previo a toma de muestra: 1 si 2 no

Datos de Identificación del participante:

Nombre: _____
Paterno Materno Nombre(s)

Edad (años): _____

Fecha de nacimiento: _____
Día / Mes / Año

Datos de contacto:

Dirección: _____

Teléfonos: _____ (cel)

_____ (trabajo)

_____ (casa)

Correo electrónico: _____

Lugar de origen: _____ Tiempo en el D.F.: _____

Sexo:

1 Hombre

2 Mujer

Grado máximo de estudios:

1 Primaria

2 Secundaria

3 Preparatoria

4 Profesional

5 Postgrado

6 No contesto

Antecedentes Heredo-Familiares:

Cáncer 1 si 2 no 3 no se

Especificar quien y que tipo: _____

Cáncer de pulmón en algún miembro de la familia 1 si 2 no

Especificar quien (es): _____

Antecedentes Personales No Patológicos:

Alcoholismo: 1 si 2 no Frecuencia: _____ Cantidad: _____

Drogas: 1 si 2 no Frecuencia: _____ Cantidad: _____

Condiciones bucales:

1. Enfermedad periodontal

2. Enfermedad gingival

3. Sin enfermedad evidente

Antecedentes Patológicos:

- 1 Alérgicos: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 2 Neurológico: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 3 Cardiovascular: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 4 Respiratorio: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 5 Gastrointestinal: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 6 Músculoesquelético: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 7 Endocrino: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 8 Dermatológico: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 9 Genitourinario: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 10 Hemolinfático: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 11 Oncológico: 1 si 2 no
Especificar: _____
- 12 Psicológico: 1 si 2 no
Especificar: _____

Medicamentos utilizados actualmente:

Nombre	Dosis	Frecuencia	Ultima dosis (Hora)

Antecedentes Tabaquismo:

Estado del paciente:

- a. Fumador (< 6 meses)
- b. Exfumador (≥ 6 meses)
- c. Nunca fumador (≤ 100 cigarros en su vida)

Edad de inicio (años):

Número de años:

Numero de cigarros por día:

Numero de paquetes año (No. años de fumador x No. cigarrillos por día)/20:

Marca de cigarros:

Con o sin Filtro:

Numero de intentos para dejar de fumar (clasificar > o < 5 intentos):

¿Hace cuánto tiempo deo de fumar?:

Tabaquismo pasivo:

Exposición ambiental al humo del tabaco: 1 si 2 no

Especificar (domicilio, trabajo, coche, bares etc.): _____

Intensidad (número de horas): _____

Frecuencia (número de días por semana): _____

Exposición a humo de leña:

1 Si 2 No

Intensidad (número de horas): _____

Frecuencia (número de días por semana): _____

Historia Ocupacional (ATS-DLD-78):

Nombre del lugar donde trabajo más tiempo: _____

Numero años que trabajo en este lugar: _____

Actividad principal de la empresa o lugar donde trabajó: _____

Actividad que desarrollaba en el lugar de trabajo: _____

Trabajo por un año o más en un lugar con polvo:

1 Si 2 No Tiempo: _____

Especifique trabajo o industria: _____

Trabajo por un año o más en un lugar con gas o vapores químicos:

1 Si 2 No Tiempo: _____

Especifique trabajo o industria: _____

Exposición a alguno de los siguientes químicos:

Industria metalúrgica (Radón, coca)	1 Si	2 No
Fabricación de baterías, (Cadmio)	1 Si	2 No
Pintura (Cadmio)	1 Si	2 No
Proceso da galvanización (Cadmio)	1 Si	2 No
Industria Química (Cromo y Berilio, aluminio)	1 Si	2 No
Industria petroquímica (ácido sulfúrico)	1 Si	2 No
Industria de fertilizantes (ácido sulfúrico)	1 Si	2 No
Industria maderera y de papel (ácido sulfúrico)	1 Si	2 No
Hidrometalurgica (ácido sulfúrico)	1 Si	2 No

Industria química (Bis cloro-metil-éter y cloro-metil-éter)	1 Si	2 No
Industria del acero (coca)	1 Si	2 No
Túneles, Cantera, Minería, Construcción (Silica)	1 Si	2 No

Trabajo involucrado con alguno de estos procesos:

Fundición del arsénico	1 Si	2 No
Gasificación del carbón	1 Si	2 No
Fundimiento de hierro o acero	1 Si	2 No

Estudios realizados en el último año:

- 1 Radiografía de Tórax:
 - i. Fecha:
 - ii. Resultado:
- 2 Tomografía computada Tórax- Helicoidal:
 - i. Fecha
 - ii. Resultado

Enfermedad Actual (Solo para pacientes con sospecha de cáncer)

Fecha del diagnóstico:
Diagnóstico histopatológico
No. Biopsia:
Reporte de Patología: _____

Estadio de la enfermedad:

- 1 I A
- 2 I B
- 3 II A
- 4 II B
- 5 III A
- 6 III B
- 7 IV
- 8 No estatificado

Metástasis: Si No Localización: _____

Tratamiento:

Quimioterapia:

- a. SI
- b. No
- c. Se desconoce

Esquemas de quimioterapia:

1. CDDP + Paclitaxel
2. CBP + Paclitaxel

3. **CDDP + Gemcitabina**
4. **CDDP + Docetaxel**
5. **CDDP + Vinorelbine**
6. **Sin quimioterapia**
7. **Se desconoce**

Radioterapia:

1. SI
2. No
3. Se desconoce

Dosis total de radioterapia: _____

Cirugía:

1. SI Tipo de cirugía:
2. No
3. Se desconoce

Respuesta (RESIST)

1. Respuesta completa (RC)
2. Respuesta parcial (RP)
3. Enfermedad estable (EE)
4. Progresión

Sobrevida global: (meses desde el diagnostico hasta el último contacto con el paciente):_____

Sobrevida libre de enfermedad: (Meses desde el diagnóstico hasta recaída):_____



Anexo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Patrones de Expresión Diferencial en el Transcriptoma y Proteoma de Saliva de Fumadores con Adenocarcinoma de Pulmón. Estudio Fase I Preclínico-Exploratorio

México, D.F., a __ de _____ de 201_

Por medio de la presente hago constar que por mi propio derecho, estoy de acuerdo en participar en el proyecto de investigación “Patrones de Expresión Diferencial en el Transcriptoma y Proteoma de Saliva de Fumadores con Adenocarcinoma de Pulmón Estudio Fase I Preclínico-Exploratorio”.

Estoy enterado de que mi participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de saliva.

Se me ha explicado que la toma de saliva no implica ningún riesgo y que la única molestia que podría presentarse es náusea. Asimismo, estoy enterado que la información obtenida del estudio es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores y sólo será utilizada para conocer los antecedentes. Estoy consciente de que mi participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decido no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Nombre del participante:

Firma del investigador:

Fecha: _____

Fecha: _____

¿Se otorgó copia del documento
al Participante? Si: ____ No: ____

Nombre del Testigo 1

Nombre del Testigo 2:

Firma del testigo 1

Firma del testigo 2

Fecha: _____

Fecha: _____

Anexo 3

Colección, procesamiento y almacenamiento de muestra de saliva.

Conforme se ha incrementado un mayor conocimiento en el campo se ha demostrado la relevancia de una adecuada colección, procesamiento y preservación de las muestras de saliva, donde el primer paso para cualquier análisis es realizar un adecuado protocolo ya que muchos factores y variables pueden afectar la composición de la muestra de saliva, como ritmo circadiano, estimulaciones, estado físico, ejercitación, medicación, ingesta de alimentos, género y edad y la actividad proteolítica y enzimática propia del proteoma, todo en conjunto lo califica como un proteoma altamente complejo y dinámico.(59)

Se han desarrollado diferentes métodos y aparatos para la colección de las muestras de saliva como condiciones de reposo o estímulos físicos o químicos, copa Lashley (y sus modificaciones) y aparato de Schneyder. (4)

Sin embargo, se ha consensado la necesidad de tener un protocolo estandarizado que pueda aplicarse en los distintos centros de investigación, el cual sea sencillo, fácil y rápido de realizar, con el fin de tener estudios y resultados más concordantes entre los distintos grupos de investigación, donde el protocolo que cumple con las características sería el de *Obtención de Saliva Global No estimulada*. (3)

El protocolo de *Obtención de saliva Global No estimulada* consiste en pedir al sujeto en cesar de fumar, consumir alimentos o usar productos de higiene oral una hora antes de la toma de muestra. El sujeto debe realizar un enjuague con agua 5 minutos antes de empezar a donar la muestra de saliva y debe mantenerse de preferencia sentado. Debe recordársele que la saliva debe ser de “flujo natural” es decir no realizar movimiento bucal alguno y permitir únicamente que la saliva se acumule en el piso de la boca y cada que sienta una acumulación importante de saliva “entregarla” en un tubo Falcon de boca ancha. El tubo siempre debe mantenerse en hielo para retrasar la actividad enzimática de las proteínas presentes en la salival. La toma de muestra debe suceder en alrededor 15 minutos y se debe colectar un alrededor de 5 mL y debe ser procesada inmediatamente. (3, 59)

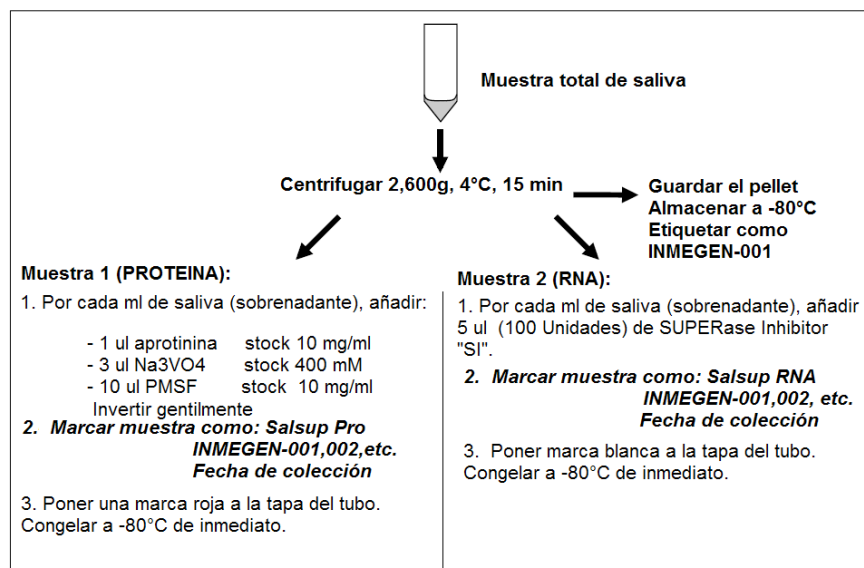
Procesamiento. El procesamiento consiste básicamente en separar el sobrenadante de la porción celular o pellet, para lo cual se centrifuga a una velocidad de 10,000 rpm por un tiempo alrededor de 10 minutos, pasado lo cual deberá observarse la adecuada separación de ambas fases. Posteriormente se deben hacer alícuotas de alrededor de 1mL y añadir los inhibidores de proteasas que hayan sido elegidos para el estudio. (3)

Almacenamiento. El almacenamiento recomendado para las muestras de saliva es -80°C, pues se ha demostrado que a temperaturas más altas -20°C y 4°C aún existe actividad proteolítica de algunas enzimas con el transcurso de tiempo, lo cual puede interferir con el análisis de las proteínas.*(3)

Protocolo para colección, procesamiento, estabilización y almacenamiento de saliva

Dr. David Wong, Laboratorio UCLA

1. Citar al sujeto, preferentemente entre 9-11 am; pida previamente al sujeto el abstenerse de comer, tomar bebidas o usar productos de higiene oral en por al menos 1 hora antes de la colección.
2. 5 minutos antes de la colección, pedir al sujeto realizar un enjuague con agua simple.
3. Después del enjuague (pasados los 5 minutos), pida al sujeto escupir en un tubo Falcon (de 50cc), **manteniendo el tubo en hielo** en por ejemplo, un recipiente de poliestireno. Recuerde al sujeto el no toser moco, flema o esputo. Se debe coleccionar mínimo 5 ml de saliva, y el tiempo de colección no debe rebasar los 30 minutos.
4. Centrifugar a 2,600g por 15 minutos a 4° C. Si se observa que la separación de las fases ha sido incompleta, centrifugar nuevamente durante 20 minutos.
5. Colectar la mayor cantidad posible del sobrenadante en un tubo Falcon (de 15cc) y agitar brevemente. **Guarde el pellet en un tubo eppendorf y almacénelo a -80°C.** Dividir el espécimen en 2 muestras: en un Criotubo (de 2ml) pipetear 1ml y manejar como muestra 1 para estudio de proteínas. Tratar el resto de sobrenadante como muestra 2 para estudio de RNA y alicuotar fracciones de 1ml en Criotubos (de 2ml). Añadir los regentes a la muestra 1 y 2 apropiadamente, como se indica abajo. Las muestras deben ser procesadas y congeladas en un tiempo de 30 minutos a partir del momento de la colección.



PROTOCOLO ELISA

Anexo 4

- Realizar cálculo de muestra de interés para 10 µg en base a previa cuantificación de proteínas.
- Ya calculada la cantidad de muestra requerida para los 10 µg, restar a 1000 µL (que corresponderán al buffer en que irán diluidas estas). ($X \mu\text{L muestra} - 1000 \mu\text{L}$). Así quedará un total de 100 µL *Muestra + Buffer de Carbonatos*.
- La preparación del Buffer de Carbonatos viene detallada en Anexo "*Soluciones para ELISA*".
- La técnica ELISA es muy sensible, por lo que se cargará en cada pozo lo correspondiente a 1 µg; en éste caso y ya con la muestra preparada como se menciona previamente correspondería a 100 µL de la muestra en buffer para en teoría cargar 1 µg de proteína.
- A continuación en las placas ELISA se cargarán 100 µL de muestra en buffers por triplicado llevando registro en hoja de que muestra corresponde a cada pozo. (Es importante que la placa sea de característica Nunc Maxisorb Apogent de fondo plano, tanto para que la muestra de proteína o antígeno quede adherido al fondo del pozo y fondo plano para que sea posible medirlo mediante el método espectrofotométrico). Al procedimiento de cargar la placa con la muestra se le llama "Forrar la placa".
- La placa debe incubarse toda la noche para permitir la mayor adhesión posible al fondo del pozo.
- Ya que incubó la placa forrada toda la noche se procederá a realizar lavados con solución PBS 1x -Tween 0.1% (Para preparación de PBS-Tween ver hoja anexo). Tener el PBS-Tween en una piseta limpia.
- Para lavar la placa se debe tomar firmemente la placa de frente a la tarja y de un solo movimiento fuerte de vaivén tirar el contenido de esta. Es importante tomar en cuenta que no se debe tocar la parte trasera de la placa con los dedos pues podría dejar residuos de grasa que dificultaría la lectura, (usar guantes). **Nota:** Algunos experimentos ELISA podrían requerir la recuperación de la muestra no absorbida, tomar en cuenta esto a la hora de decidir si eliminar la muestra no absorbida o deshacerse de la misma.
- En la mesa de trabajo se colocan 5 sanitas una sobre otra y se golpea firmemente la placa boca abajo contra el papel absorbente para eliminar remanentes (3 veces).
- Con la piseta conteniendo PBS-Tween se coloca en cada pozo alrededor de 200 µL en cada pozo para realizar los lavados de la placa. No aplicar chorro directamente al fondo del pozo sino dejarlo caer por la pared del pozo.
- Se deja la placa 5 minutos con el PBS-Tween sin movimiento a temperatura ambiente y posteriormente realizar 2 veces más este mismo procedimiento de lavado.
- Ya que se realizaron los lavados se procederá al Bloqueo de sitios inespecíficos.
- Con la solución de Bloqueo (Ver detalles de esta en hoja anexa) se colocan 200 µL en cada pozo que contuvo muestra incubando y se deja por media hora incubando a temperatura ambiente sin movimiento.

- Una vez que ha pasado el tiempo requerido se procede a eliminar la solución de bloqueo de manera similar a la descrita para eliminar la muestra no absorbida y se realizan 3 lavados con PBS-Tween 3 veces de la misma manera que se describió previamente.
- El siguiente paso es incubar el anticuerpo primario, para lo cual ya se debió haber calculado la dilución requerida del Anticuerpo (Ejemplo 1:100; 1,1'500, etc.), el cual debe ir diluido en PBS-Tween 0.1%. Para evitar contratiempos es recomendable tener calculadas las diluciones requeridas tanto para el Anticuerpo Primario como para el Secundario.
- El cálculo de la cantidad requerida de anticuerpo y buffer debe ser basada en que en cada pozo se deberá colocar una cantidad final de 100 µL de Anticuerpo diluido, así como en cantidad de pozos que se incubarán con este.
- Para hacer un procedimiento más preciso se recomienda usar pipeta multicanal pues se procurará una distribución uniforme y una entrega más rápida de los anticuerpos diluidos. De ser posible calcular con excedente para evitar la falta de solución con anticuerpo de interés. (Si se tienen 96 pozos con antígeno preparar para 99).
- El anticuerpo primario se puede quedar incubando toda la noche a 4°C sin movimiento o de lo contrario una hora después de la entrega los pozos.
- Ya que incubo el anticuerpo primario este se puede recuperar en un tubo falcon de 50 mL para volver a ser reutilizado hasta por 3 veces. Al momento de recuperarlo hacerlo con cuidado y sin tocar el fondo del pozo con la punta para evitar quitar antígeno-anticuerpo.
- A continuación se golpean las placas de frente 3 veces contra papel sanita absorbente colocado en la mesa de trabajo de la misma manera como se comentó previamente.
- Realizar 3 lavados con PBS-Tween 0.1% 5 min a temperatura ambiente.
- Se incuba el anticuerpo secundario tomando en cuenta las consideraciones indicadas para el anticuerpo primario y obviamente, la especificidad de la especie. De igual manera se debe colocar un total de 100 µL de Ab secundario diluido en PBS-Tween 0.1 % en cada pozo.
- El anticuerpo secundario se incubará por un período de media hora a temperatura ambiente, sin movimiento.
- El anticuerpo secundario también se puede recuperar en tubo Falcon de 50 mL especificando cuantas veces se ha usado (Se puede usar hasta 3 veces).
- Se eliminan remanentes con 3 golpes, placa de frente contra papel absorbente y se realizan 3 lavados con PBS- Tween como se describió previamente.
- Se debe tener listo el sustrato OPD -Peróxido de Hidrógeno al 30% (El peróxido se le pone hasta antes de usarlo) para el "revelado" de las placas. (Ver hoja anexo).
- Asimismo tener Acido Sulfúrico 2N – 100 µL para el parado de la reacción.
- En cada pozo se colocan 100 µL de OPD y se permite que torne de color hasta que se crea indicado para la reacción pues no dará mayor reacción el sustrato. Es recomendable tener controles para valorar que la reacción es genuina y está dándose por la reacción Antígeno Anticuerpo y no por artificios, por lo que se recomienda tener como controles negativos en 3 filas de pozos por triplicado.
 - PBS 100 µL (en lugar de antígeno) – Anticuerpo primario – Anticuerpo Secundario.

- PBS 100 μ L (en lugar de antígeno) – **Sin** anticuerpo primario – Anticuerpo Secundario.
- PBS 100 μ L (en lugar de antígeno) – Anticuerpo primario – **Sin** anticuerpo secundario.

Estos controles también se someterán a proceso de revelado y servirán para valorar la veracidad del experimento.

- Ya que se ha dado la reacción se procede rápidamente a parar la misma usando Acido Sulfúrico 2N – 100 μ L en cada pozo.
- A continuación se le en espectrofotómetro a 492 nm. Se promedian el triplicado de Absorbancias y se realiza la estadística requerida.

SOLUCIONES PARA ENSAYO ELISA

Buffer de Carbonatos

-Bicarbonato de Sodio. (NaHCO_3) – 580 mg

Carbonato de Na (Anhidro). Carbonato – 318 mg

-Mezclar las sales.

-Agregar 60 mL de agua MiliQ.

-Ajustar pH a 9.6

-Aforar a 100 mL

-Etiquetar y almacenar a 4°C.

Solución PBS 10X

Cloruro de Sodio - 87.5 g

$\text{NAH}_2\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{O}$ Monobásico 2.62 g

NA_2HPO_4 Anhidro Dibásico 11.5 g

H_2O 1,000 mL

Mantener a 4°C.

Solución PBS 1X pH= 7.2

PBS 10 X 100 mL + 900 mL de H₂O

Para que sea PBS1X /Tween 0.1 % Al PBS 1X se le adiciona 1 mL de detergente Tween.

Preparación del OPD

4 mg de OPD

5 mL de Ac Cítrico al 0.1 M

5 mL de Citrato de Sodio al 0.1 M

4 uL de Peróxido de Hidrógeno (ya que se vaya a llevar a cabo la reacción).

Ácido sulfúrico

El ácido sulfúrico debe ser preparado a concentración 2N

Solución de Bloqueo

Se utiliza el siguiente agente de bloqueo, el cual no requiere preparación ni dilución:

PROD # 37518

SuperBlock Blocking Buffer. Thermo Scientific.