UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Obtención de plasma sanguíneo y de médula ósea para análisis proteomico diferencial entre niños sanos y con diagnóstico de Leucemia Linfoide Aguda

Wilmer Alexis Urrego Moncada

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

Obtención de plasma sanguíneo y de médula ósea para análisis proteomico diferencial entre niños sanos y con diagnóstico de Leucemia Linfoide Aguda

Wilmer Alexis Urrego Moncada

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Master en Ciencias - Bioquímica

Directora
YADI ADRIANA UMAÑA PÉREZ
Química MSc Doctor en Ciencias

Línea de Investigación en Biomarcadores en cáncer
Grupo de Investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

“Todo aquel que está seriamente comprometido con el cultivo de la ciencia, llega a convencerse que en todas la leyes del universo esta manifiesto un espíritu infinitamente superior al hombre, y ante el cual nosotros con nuestros poderes debemos sentirnos humildes"

Albert Einstein

Agradecimientos

El autor expresa sus agradecimientos, a la Dirección de Investigación sede Bogotá (Proyectos DIB14718 y 20708), a la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación Colombia Corre para la investigación por el cáncer (Proyecto DIB15116) por la financiación de este trabajo.
Al programa Jóvenes investigadores e innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda Año 2011 por financiarme parte de mis estudios de Maestría.

A la profesora Myriam Sánchez de Gómez. Directora del Grupo de Investigación en Hormonas por permitir mi formación de Maestría en el grupo y por su apoyo académico.
A la profesora Adriana Umaña Pérez. Por su asesoría científica y humana como directora de este trabajo.
A la profesora Martha Lucia Serrano. Por el planteamiento del proyecto y dirección al inicio de mi formación de Maestría.
A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Hormonas por compartir en el ámbito académico y social en este tiempo de formación en Maestría.

A la Dra. Patricia Cuervo Escobar, Mónica Losada y Andrés Rodríguez del Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, por la colaboración brindada en el análisis por espectrometría de masas.

A mi familia y amigos por su incondicional respaldo en todos los buenos y malos momentos a lo largo de este proceso de formación.

Resumen

Actualmente el diagnóstico de la leucemia linfoide aguda (LLA) se realiza mediante la exploración citogenética y la definición del inmunofenotipo en muestras de médula ósea obtenidas por punción lumbar de los pacientes en los que se sospecha desarrollo de la enfermedad. No obstante, la comunidad científica ha planteado la necesidad de buscar moléculas marcadores de estadios de enfermedad en fluidos biológicos de más fácil acceso para evitar procedimientos invasivos dolorosos para los pacientes. En este sentido el plasma sanguíneo se considera una potencial fuente de biomarcadores de origen proteico provenientes de todos los tejidos del cuerpo; especialmente útil en enfermedades de tipo sistémico como leucemia. Este trabajo utilizó una estrategia basada en electroforesis bidimensional como herramienta de alta resolución para la separación de proteínas del plasma sanguíneo previa reducción de la complejidad de la muestra con cromatografía de afinidad para la remoción específica de las dos proteínas más abundantes del plasma: albúmina e inmunoglobulina G. Mediante programas de análisis de imágenes detectaron “spots” o manchas de proteína diferencialmente expresadas entre muestras de pacientes diagnosticados con LLA tipo B y muestras de individuos sanos, las cuales se analizaron mediante espectrometría de masas y análisis bioinformatico para su identificación. Se logró identificar varias proteínas con expresión diferencial, entre las cuales se encuentran: La proteína de unión a vitamina D, Apolipoproteina E, Apolipoproteina A-1 y la Glicoproteína acida 1-alfa. Estos resultados preliminares sirven de base para la búsqueda de potenciales biomarcadores sanguíneos para el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave: Leucemia, proteómica, biomarcadores, electroforesis, masas.

Abstract

Currently, the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) is performed by cytogenetic examination and definition of the immunophenotype in bone marrow which is obtained by lumbar puncture of patients in whom the development of the disease is suspected. However, the scientific community has raised the need to find specific biomarkers of the disease, mainly in biological fluids of easier access to avoid invasive and painful procedures for patients. In this regard the blood plasma is considered a potential source of protein biomarkers from all body tissues; this is especially useful in acute systemic diseases such as leukemia. This work proposed a strategy based on two-dimensional electrophoresis for the separation of plasma proteins previous reduction of sample complexity by affinity chromatography that causes specific removal of the two most abundant proteins in plasma: albumin and immunoglobulin G. Image analysis allowed to identify differentially-expressed protein spots between samples of patients diagnosed with ALL type B and samples from healthy individuals. Those spots were analyzed by mass spectrometry and bioinformatic analysis for protein identification. This methodology achieved to identify several proteins with differential expression as Vitamin D bindig protein, apolipoprotein E, apolipoprotein A-1 and alpha 1-acid glycoprotein. These preliminary results can be the basis for finding potential blood biomarkers for the diagnosis of this disease.

Keywords: Leukemia, proteomics, biomarkers, electrophoresis, mass.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
2. JUSTIFICACIÓN 5
3. ESTADO DEL ARTE 7
4. Marco teórico 10
4.1. Leucemia Aguda 10
4.2. Causas y factores de riesgo de LLA 12
4.3. Diagnóstico y tratamiento 12
4.4. Incidencia y mortalidad 13
4.5. La complejidad del plasma sanguíneo 14
4.6. Electroforesis bidimensional 15
4.6.1. Preparación de las muestras para 2DE. 15
4.6.2. Visualización de proteínas en geles bidimensionales 16
4.7. Análisis de imágenes 16
4.8. Espectrometría de masas en proteómica 17
5. Objetivos 19
5.1. Objetivo General 19
5.2. Objetivos específicos 19
6. Materiales y métodos 20
6.1. Obtención de las muestras de plasma sanguíneo 20
6.1.1. Selección de potenciales sujetos de estudio 20
6.1.2. Descripción de las intervenciones 20
6.1.3. Obtención del plasma sanguíneo 21
6.2. Reducción de la complejidad del plasma sanguíneo 21
6.2.1. Inmunodepleción de albúmina e inmunoglobulina G 21
6.2.2. Enriquecimiento de proteínas de baja abundancia 21
6.3. Cuantificación de proteínas por ácido bicinconínico (BCA) 22

6.4. Precipitación de proteínas 22
6.4.1. Precipitación con acetona 22
6.4.2. Precipitación con ácido tricloroacetico – acetona 22
6.4.3. Precipitación con metanol – cloroformo 23
6.5. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) 23
6.6. Electroforesis bidimensional 23
6.6.1. Primera dimensión: enfoque isoeléctrico 23
6.6.2. Segunda dimensión: Electroforesis SDS-PAGE 24
6.6.3. Visualización de proteínas en geles bidimensionales 24
6.7. Análisis de imágenes 24
6.8. Espectrometría de masas 25
7. Resultados 26
7.1. Cuantificación total de proteínas en plasma sanguíneo y plasma de médula ósea 26
7.2. Reducción de la complejidad de proteínas del plasma 27
7.2.1. Perfil electroforético de proteínas del plasma sanguíneo 27
7.2.2. Cuantificación de proteínas en plasmas tratados con las columnas de ProteoPrep® y ProteoMiner™ 27
7.2.3. Evaluación métodos reducción de la complejidad del plasma por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 29
7.3. Selección de las condiciones óptimas para la electroforesis bidimensional 30
7.3.1. Selección del método de precipitación de proteínas 30
7.3.2. 32
Selección del buffer de solubilización para el enfoque isoeléctrico 32
7.3.3. 33
Optimización del programa de enfoque isoeléctrico 33
7.3.4. 34
Evaluación métodos tinción para geles bidimensionales 34
7.4. Evaluación métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por electroforesis bidimensional 35
7.5. Evaluación análisis de proteínas por espectrometría de masas 37
7.6. Obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B 40
7.7. Análisis de imágenes comparativo entre el plasma de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B 42
7.7.1. Análisis de geles de plasma sanguíneo 43
7.7.2. Análisis de clases para geles de plasma sanguíneo 45

7.8. Análisis de proteínas por espectrometría de masas de spots con expresión diferenciales en plasma sanguíneo 48
7.9. Obtención de geles bidimensionales de plasma de médula ósea 50
7.9.1. Cuantificación de Proteínas en plasma de médula ósea 50
7.9.2. Obtención perfiles proteicos de plasma de médula ósea 51
7.9.3. Cuantificación de proteínas en plasma de médula ósea depletados 52
7.9.4. Electroforesis bidimensional de plasma de médula ósea depletado 53
7.9.5. Análisis de imágenes de plasma de médula ósea 54
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 58
8.1. Cuantificación de proteínas en plasma sanguíneo y plasma de médula ósea 58
8.2. Reducción de la complejidad del plasma sanguíneo y plasma de médula ósea 59
8.3. Selección de las condiciones óptimas para la electroforesis bidimensional 60
8.4. Comparación de plasma sanguíneo de niños sanos y diagnosticados con LLA-B 61
8.5. Análisis de imágenes de geles de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B 62
8.6. Análisis de proteínas con expresión diferencial en plasma sanguíneo 64
Las proteínas que mostraron expresión diferencial entre el plasma de individuos sanos y el plasma de niños diagnosticados con LLA-B, pueden de manera directa o indirectamente relacionarse con el desarrollo de la enfermedad, por tanto se consolido la información referente a función de cada proteína identificada y su posible papel en carcinogénesis. 66
8.7. Obtención geles bidimensionales de plasma de médula ósea de niños diagnosticados con LLA-B 66
9. CONCLUSIONES 69
10. PERSPECTIVAS 70
11. 71
BIBLIOGRAFIA 71

Lista de Figuras

Figura 1. Perfil electroforético del plasma sanguíneo. 28
Figura 2. Evaluación de los métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por electroforesis SDS-PAGE. 30
Figura 3. Evaluación métodos de precipitación de proteínas del plasmas después de la depleción por columna ProteoPrep®. 32
Figura 4. Efecto del buffer disolución IEF en la separación de proteínas por 2DE 33
Figura 5. Efecto del método de visualización de spots de proteína en geles bidimensionales. 35
Figura 6. Evaluación métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por 2DE. . 36
Figura 7. Evaluación proteínas de menor interés en los métodos de reducción de la complejidad del plasma. 37
Figura 8. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-MS/MS en geles en formato de 7cm. 39
Figura 9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-MS/MS en geles en formato de 18cm. 40
Figura 10. Geles bidimensionales de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B. 42
Figura 11. Orden jerárquico establecido para el análisis de imágenes de plasma sanguíneo. 43
Figura 12. Detección y match en los geles bidimensionales en el programa Melanie 7.0... 45
Figura 13. Análisis factorial para los geles de muestras de plasma sanguíneo. 46
Figura 14. *Spots* con expresión diferencial en los plasmas sanguíneos. 47
Figura 15. *Spots* únicos representativos de cada grupo en el análisis del plasma sanguíneo. 48
Figura 16. *Spots* de proteína únicos en plasma sanguíneo de la muestra de LLA-B después del tratamiento de inducción. 49
Figura 17. Identificación de proteínas diferenciales entre niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B. 50
Figura 18. Perfil electroforético de plasma de medula ósea. 52
Figura 19. Perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma de médula ósea 53
Figura 20. Perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma de médula ósea depletados. 54
Figura 21. Análisis de factores para los geles de muestras de plasma de médula ósea. 56
Figura 22. *Spots* con expresión diferencial en los plasmas de médula ósea. 57
Figura 23. Spots de proteína únicos en plasma de medula ósea antes de la inducción 58
Figura 24. Ampliación de geles que muestran spots de proteína con expresión diferencial para la muestra de LLA-B antes y después del tratamiento de inducción 67
Figura 25. Ampliación de geles que muestran spots de proteína con expresión única para la muestra de LLA-B antes del tratamiento de inducción. 68

Lista de Tablas

Tabla 1. Clúster de diferenciación para clasificar las leucemias linfoides agudas 12
Tabla 2. Sub-clasificación de las leucemias agudas de linaje B y de linaje T 12
Tabla 3. Resultados de cuantificación de proteínas en plasmas sanguíneos de niños sanos..... 27
Tabla 4. Resultados cuantificación de proteínas en plasma sanguíneo de niños diagnosticados con LLA-B 27
Tabla 5. Contenido de proteínas en las distintas fracciones proteicas del plasma tratado con las columnas ProteoMiner™ y ProteoPrep®..... 29
Tabla 6. Porcentaje der recuperación de proteínas por las columnas ProteoMiner™ y ProteoPrep®..... 30
Tabla 7. Descripción del programa IEF para la separación de proteínas del plasma sanguíneo. .. 34
Tabla 8. Lista de proteínas identificadas a partir de spots de proteína en geles de 7cm..... 39
Tabla 9. Lista de proteínas identificadas a partir de spots de proteína en geles de 18cm 40
Tabla 10. Parámetros seleccionados para la identificación de spots en los geles bidimensionales de plasma sanguíneo.. 44
Tabla 11. Conteo de match entre los diferentes geles bidimensionales para plasma sanguíneo. .. 45
Tabla 12. Resumen de *match* con expresión en los 3 grupos (controles, antes y después de la inducción) con un *fold* mayor a 3..... 48
Tabla 13. Parámetros de identificación de proteínas mediante el motor de búsqueda MASCOT modo MS/MS..... 50
Tabla 14. Resumen de proteínas con expresión diferencial en LLA-B 51
Tabla 15. Contenido de proteínas en los plasmas de médula ósea. 51
Tabla 16. Contenido total de proteínas en las diferentes fracciones durante la inmunodepleción de una plasma de médula ósea con diagnóstico de LLA-B. 53
Tabla 17. Conteo de *match* entre los diferentes geles bidimensionales para plasma de médula ósea. 55
Tabla 18. Resumen de match en plasma de médula ósea con expresión en los 2 grupos (antes y después de la inducción) con un *fold* mayor a 3. 57
Tabla 19. Valores de correlación (Corr) entre geles duplicado de muestras de plasma sanguíneo. 64
Tabla 20. Valores de correlación (Corr) entre geles de las muestras del grupo control y el grupo de pacientes. 64
Tabla 21. Función biológica y posible papel en cáncer de proteínas con expresión diferencial entre niños sanos y pacientes con LLA 66

Listado de abreviaturas

BCA	Ácido bicinconinico
BSA	Albumina bovina sérica
CBB	Azul de coomassie
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetra Acético
2DE	Electroforesis bidimensional
ESI	Ionización por Electrospray
FAB	Clasificación francesa-americana-británica
FT-MS	Transformada de Fourier
HUPO	Organización del proteoma humano
IAA	Iodoacetamida
IEF	Enfoque Isoeléctrico
IgG	Inmunoglobulina G
IPGs	Gradientes de pH inmovilizados
IT	Trampa de iones
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoide Aguda tipo B
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
MALDI	Ionización por Disociación Laser Asistida por Matriz
MAbs	Anticuerpos monoclonales específicos
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MW	Masa molecular
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PBP	Proteína precursora pro-plaquetas básica
PF4	Factor de plaquetas 4
pI	Punto isoeléctrico
PRED	Prednisolona
Q	Cuádruplo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SELDI	Ionización por desorción laser facilitada por superficie
TCA	Ácido tricloroacético
TOF	Tiempo de vuelo

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoide aguda (LLA) se considera el tipo más común de neoplasia del sistema hematopoyético y se caracteriza por la rápida progresión de precursores linfoides transformados en la médula ósea y demás órganos hematopoyéticos (Jiang et al., 2011). Las leucemias representan el 30% del total de cáncer en menores de 15 años, de las cuales más del 75% corresponden a LLA (Belson et al., 2007). En Colombia la tasa anual de incidencia de leucemias en niños y niñas es de 5,6 y 6 por 100.000 respectivamente y la tasa de mortalidad de 4,5 y 4,2 (Castro et al., 2007). Hoy en día la leucemia no es una enfermedad prevenible y su detección es compleja y se aplica a pacientes con sospecha de la enfermedad que presentan síntomas específicos (Ballesteros et al., 2013). El diagnóstico completo de la leucemia requiere realizar un aspirado de médula ósea, metodología invasiva y dolorosa para los pacientes, para la completa caracterización de la de la enfermedad a través de estudios de citogenética e inmunofenotipo (Piñeros et al., 2007). Por lo anterior, se requiere encontrar biomarcadores de esta enfermedad en fluidos corporales de más fácil acceso como el plasma sanguíneo que a futuro permitan la implementación de metodologías de diagnóstico mínimamente invasivas para los pacientes.

Como biomarcadores en cáncer se consideran moléculas producidas por el tumor o por el organismo que pueden potencialmente proveer material biológico útil para la detección, diagnostico, respuesta al tratamiento y recurrencia de esta enfermedad. Un biomarcador debe preferiblemente ser detectable en fluidos biológicos de fácil acceso, ser diferencialmente expresado entre pacientes y personas sanas y ser específico para un determinado tipo de cáncer (Tainsky, 2009).

El plasma proveniente de la sangre es una rica fuente de información que refleja un estado fisiológico, metabólico y biológico asociado a una enfermedad (Petricoin et al., 2006). Aunque históricamente el suero ha sido el principal fluido sanguíneo estudiado para la búsqueda de biomarcadores de enfermedades, hoy en día es ampliamente aceptado por muchos grupos de investigación incluyendo la organización del proteoma humano (HUPO), que el plasma refleja mejor que el suero el estado fisiopatológico de un individuo (Tammen et al., 2005).

El análisis del proteoma del plasma sanguíneo enfrenta varios desafíos para la identificación y caracterización de proteínas que pueden tener potencial uso como biomarcadores. El principal reto es el amplio rango dinámico de proteínas, en donde más del 90% del total de proteínas está representado por menos de 10 proteínas, siendo la albúmina con un 65% (~45 mg/mL) y la inmunoglobulina G con un 15% (~10 mg/mL) las más abundantes (Rengarajan et al., 1996). Actualmente es aceptada la posibilidad de concentrar las proteínas de baja abundancia o depletar las proteínas de alta abundancia, para el análisis de las proteínas del plasma mediante metodologías de alta resolución como la cromatografía y la electroforesis. Sin embargo, no hay consenso acerca de cuál acercamiento representa mejores resultados. La literatura abarca diferentes metodologías

de fraccionamiento de las proteínas del plasma así como sus limitaciones (Leger et al., 2011; Luque et al., 2007).

Una de las estrategias para la separación de las proteínas del plasma y de diversos proteomas es la electroforesis bidimensional (2DE), en esta técnica las proteínas son primero separadas de acuerdo a diferencias en su punto isoeléctrico (pI) mediante la técnica conocida como enfoque isoeléctrico y después se separan en base a su masa molecular (MW) en geles de poliacrilamida. La principal ventaja de la 2DE es la visualización de cientos a miles de proteínas en un solo gel y el acoplamiento a análisis de imágenes permite la comparación directa de los proteomas o mapas 2DE entre condiciones de salud y enfermedad, este acercamiento es conocido como proteómica diferencial. La principal limitación de esta estrategia proteómica es la baja posibilidad de automatización, lo cual la hace útil para el análisis de un número limitado de muestras. Adicionalmente la técnica 2DE tiene mucha variación inter-geles y es ineficiente en la detección de proteínas con base en su hidrofobicidad (Fountoulakis et al., 2003) .

De la mano de la 2DE se encuentra la espectrometría de masas (MS) para la identificación de las proteínas de interés previa digestión enzimática de los *spots* de proteína. El acople de diferentes técnicas con MS es hoy en día, muy utilizado en el análisis de muestras complejas de proteína (Jemal et al., 2011). Dos técnicas de ionización, MALDI y ESI, son las más comúnmente usadas para volatilizar e ionizar las proteínas y péptidos para análisis por MS. La MS permite la identificación de proteínas de acuerdo a su huella peptídica. Sin embrago; el uso de un solo analizador limita el análisis de muestras complejas, por lo tanto se han desarrollado diferentes estrategias como el acoplamiento de varios sistemas de detección o espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la espectrometría de masas acoplada a métodos de separación como la cromatografía liquida (LC-MS/MS) (Steen et al., 2004).

En este trabajo se evaluara dos diferentes estrategias para reducir la complejidad del plasma sanguíneo que permita su análisis mediante 2DE: 1) la inmunodepleción de las dos proteínas más abundantes del plasma: la albúmina e IgG usando columnas ProteoPrep® (SIGMA-ALDRICH) y 2) el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia a través de las columnas ProteoMiner™ (Bio-Rad). Una vez seleccionada una estrategia para reducir la complejidad del plasma sanguíneo, se optimizaron las condiciones experimentales para la obtención de los proteomas del plasma sanguíneo. Finalmente se obtuvieron y compararon los plasmas sanguíneos de 3 niños sanos y 1 niño diagnosticado con LLA-B. También se hará proteómica comparativa del plasma de médula ósea de un niño diagnosticado con LLA-B antes y después de la primera fase del tratamiento conocida como inducción. Mediante programas de análisis de imágenes se identificara *spots* de proteína diferenciales entre los diferentes grupos, los cuales se analizaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para su identificación.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento descontrolado y expansión de células anormales. Si esta expansión no es controlada, esto puede desencadenar la muerte. El cáncer es causado tanto por factores externos (tabaco, radiación, agentes infecciosos) y factores internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunes). Estas condiciones pueden actuar juntas o en una secuencia para iniciar o promover carcinogénesis. A nivel mundial, una de cada ocho muertes es causada por el cáncer. Cáncer es la principal y la segunda causa de muerte en países desarrollados y países en vía de desarrollo respectivamente. Datos del 2008 indican que el cáncer más común en el género femenino es el cáncer de seno, mientras que el cáncer de pulmón y bronquios es el más común en hombres American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: American Cancer Society; 2011.

La alta tasa de mortalidad del cáncer en especial en países en desarrollo es debido a la falta de un diagnóstico temprano y la falta de acceso a tratamientos una vez este es diagnosticado. Para muchos tipos de cáncer, diagnostico en los estadios tempranos, hace los tratamientos mucho más efectivos y aumenta las tasas de supervivencia de los pacientes. En general no existen pruebas de detección temprana aplicables a gran escala para la detección del cáncer, y las existentes son de tipo invasivo (biopsia al órgano afectado), Por tal motivo se requiere encontrar biomarcadores tumorales específicos y sensibles que permitan un diagnóstico temprano de la cancerogénesis. Un biomarcador es una medida cuantificable de laboratorio de una molécula relevante biológicamente y especifica de una enfermedad que puede actuar como indicador de un estado de enfermedad en curso o futuro.
Las leucemias son el cáncer más frecuente en los niños. A nivel mundial representan aproximadamente el 35% de todos los cánceres en menores de 15 años de edad y el 27% en los menores de 20 años (Suarez et al., 2002). De éstas el 75% son leucemias linfoides agudas (LLA), un 20% leucemias mieloides agudas (LMA) y solamente el 3 a 4% son leucemias mieloides crónicas En Colombia se tiene una incidencia de LLA de 6/100.000 menores de 15 años (Piñeros et al., 2008). Los avances en los protocolos de diagnóstico y tratamiento han permitido alcanzar tasas de curación del 80%. No obstante, en Colombia la razón incidencia/mortalidad sigue siendo muy alta comparada con otros países como por ejemplo Estados Unidos (1,3 contra 5,1, respectivamente).

Este trabajo forma parte de la línea de investigación en biomarcadores en cáncer del grupo de Investigación en Hormonas, cuyo objetivo principal es la implementación de técnicas proteómicas de alta resolución como la electroforesis bidimensional (2DE) y la cromatografía liquida,

acopladas a sistemas de identificación de proteínas (espectrometría de masas y análisis bioinformatico) para estudios exploratorios en plasma sanguíneo, para la búsqueda de potenciales biomarcadores que contribuyan al diagnóstico temprano de diferentes tipos de cáncer de una manera mínimamente invasiva. Este proyecto de investigación, en particular está enmarcado en la propuesta de búsqueda de potenciales biomarcadores de leucemia linfoide aguda (LLA). Los resultados de este trabajo pueden servir de base para la búsqueda de potenciales biomarcadores de esta enfermedad.

La estrategia metodológica escogida: electroforesis bidimensional y espectrometría de masas se encuentra sustentada por los conocimientos y la experiencia adquirida por el grupo en el área de la proteomica durante los últimos años y pretende fortalecer esta área de trabajo a nivel de grupo.

3. ESTADO DEL ARTE

Los primeros estudios proteomicos en leucemias agudas linfoides y mieloides los reportan Hegedus y colaboradores en el 2005. Estos autores encontraron proteínas expresadas diferencialmente en la médula ósea de pacientes con leucemias agudas mieloides y linfoides, en particular una proteína de 8,3 kDa identificada como una ubiquitina truncada en la región C terminal (Hegedus et al., 2005). La expresión diferencial de proteínas podría potencialmente ayudar a distinguir entre varios tipos de leucemias infantiles.

En el año 2009 Shi y colaboradores (Shi et al., 2009), realizaron un estudio de los proteomas séricos de 94 pacientes diagnosticados con LLA y 84 controles mediante cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas. En este estudio se encontraron dos picos de proteínas reguladas negativamente, que se identificaron como el factor de plaquetas 4 (PF4) y la proteína precursora pro-plaquetas básica (PBP). Otras dos proteínas se encontraron reguladas positivamente en el suero de los pacientes de LLA, y ambas correspondieron a fragmentos del componente del complemento C3a.

Jiang y colaboradores (Jiang et al., 2011), usando herramientas proteómicas y varias líneas celulares de leucemia de importancia clínica (REH, 697, Sup-B15, RS4; 11) midieron la respuesta primaria (7 días) al medicamento 8-prednisolona (PRED) como un importante factor pronóstico para la clasificación del riesgo en leucemias agudas. Se identificaron varias proteínas como potenciales biomarcadores diagnósticos y reguladores de apoptosis inducidas por PRED. Después del tratamiento de las cuatro líneas celulares, estas se clasificaron en resistentes (REH) y sensibles (697, Sup-B15, RS4;11). Utilizando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) se identificaron 77 *spots* de proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0.05$) en las líneas celulares sensibles y 17 en la línea resistentes a PRED. Varias de estas se validaron mediante Western Blot incluyendo el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), Cofilina 1, la proteína 1 del canal aniónico voltaje dependiente (VDCA1) y la subunidad activadora del proteosoma 2 (PA28β). De las anteriores, PCNA tuvo especial interés debido a su papel tanto en la regulación del ciclo celular y control de la supervivencia celular. Adicionalmente validaron PCNA en 43 pacientes recién diagnosticados con LLA tras 7 días de tratamiento con PRED, mostrando que PCNA fue altamente predictivo en la respuesta al medicamento de manera independiente al subtipo molecular de leucemia, proveyendo un promisorio marcador pronóstico universal.

Recientemente Braoudaki y colaboradores evaluando la expresión diferencial en los perfiles proteómicos entre pacientes con leucemias agudas pediátricas de alto (HR) y bajo (LR) riesgo (Braoudaki et al., 2013). Encontraron proteínas que potencialmente podrían servir como

biomarcadores distintivos para clasificar la agresividad de la enfermedad. En su propuesta resaltan las proteínas Clusterin, Ceruloplasmina, Apolipoproteina E, Apolipoproteina A-IV, Apolipoproteina A-I, Gelsolin, proteína S100-A9, alfa-1 microglobulina, beta-Actina, catalasa y afamina. Adicionalmente vitronectina y plasminógeno probablemente contribuyen a la leucogénesis, mientras que la proteína bicaudal relacionada con vitamina D podría ser un significante biomarcador terapéutico de LLA pediátricas.

En años recientes, el suero y el plasma sanguíneo han probado ser útiles en el descubrimiento de biomarcadores de enfermedad. La sangre es un tejido de adquisición mínimamente invasiva y puede contener proteínas derivadas de todos los tejidos del cuerpo (Anderson et al., 2002). La obtención del plasma sanguíneo requiere el uso de agentes que evitan la formación del coágulo mediante la remoción de factores de coagulación esenciales. Entre los anticoagulantes más comunes se cuenta con el citrato y el EDTA que inhiben la coagulación y otros procesos enzimáticos por quelación de enzimas ion dependientes, por su parte la heparina actúa a través de la activación de antitrombina III (Kim et al., 2007).

Dos preguntas importantes se han hecho los diferentes grupos de investigación que trabajan en la búsqueda de biomarcadores sanguíneos mediante proteómica. Primero si es preferible usar suero o plasma sanguíneo y segundo, de trabajar con plasma cual es el anticoagulante más adecuado para su obtención. Estudios proteomicos hechos por la Organización del Proteoma Humano (HUPO) y laboratorios independientes han abordado estas preguntas mediante aproximaciones basadas en técnicas de electroforesis bidimensional y cromatografía liquida acopladas a espectrometría de masas (Anderson et al., 2002).

Se sabe que los proteomas del suero y plasma no coinciden completamente; algunas proteínas solo pueden ser detectadas después de la inducción de la coagulación. La formación del suero es un proceso bioquímico que conduce a la generación de *novo* de muchos péptidos, cuyo contenido puede verse alterado por parámetros como la temperatura y el tiempo de procesamiento de la muestra. Estos parámetros son difíciles de estandarizar en la práctica clínica de rutina. Por otra parte, ciertas proteínas se unen al coágulo de una manera inespecífica reduciendo la concentración de proteínas libres después de la formación del coágulo (Tammen et al., 2005). El análisis de proteomas de bajo peso molecular (< 15kDa) ha permitido identificar un alto número de péptidos los cuales solo están presentes en suero y al menos el 40% de todos los péptidos detectados en suero resultaron ser suero específicos. Por ello, persiste la controversia de si los biomarcadores encontrados en suero reflejan un estadio de enfermedad o se trata de péptidos generados por efectos secundarios durante la coagulación e*x vivo*.

Teniendo en cuenta lo anterior, la HUPO recomienda trabajar con plasma como un mejor reflejo del estado fisiopatológico de un individuo que el suero. A pesar de esto, el uso del suero para la búsqueda de biomarcadores en cáncer se encuentra activo, debido a que es la muestra más comúnmente encontrada en los biobancos (Tammen et al., 2005).

La abundancia diferencial de proteínas en los proteomas de plasma obtenidos con diferentes anticoagulantes es muy similar, sin embargo cada anticoagulante tiene sus limitaciones y no deben ser usados bajo circunstancias específicas. Se ha encontrado un incremento en la concentración de proteínas de unión a ion calcio en los plasmas con EDTA, así como una mayor estabilidad de muchas citoquinas. Sin embargo si se requiere ensayos donde son necesarios cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+}, el plasma con EDTA no es recomendable (Rai et al., 2005). La heparina es un glicosaminoglicano que prolonga el tiempo de coagulación de la sangre, es una molécula altamente cargada y su presencia en solución puede competir o prevenir la unión de moléculas a superficies cargadas, proceso esencial en la ionización inducida por matriz. Por su parte el citrato se encuentra en los tubos de recolección en forma líquida produciendo un efecto de dilución de las muestras (Tammen et al., 2005).

En estos mismos estudios con muestras de referencia de plasma sanguíneo realizados por la HUPO, se encontró que la contaminación por plaquetas durante el proceso de obtención del plasma causa múltiples señales peptídicas entre las muestras, por tanto se recomienda una suave remoción de las plaquetas, lo cual es benéfico para mejorar la especificidad. Dos protocolos de remoción de plaquetas son recomendados, el primero consiste en la filtración mediante un filtro estéril de baja adhesión de proteínas y el segundo consiste en una centrifugación a 2500 g por 15 minutos a temperatura ambiente (Tammen et al., 2005).

En resumen, la HUPO recomienda trabajar con plasma obtenido con EDTA como anticoagulante y aplicar alguno de los tratamientos mencionados para obtener el plasma pobre en plaquetas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Leucemia Aguda

Las leucemias son un grupo de enfermedades que afectan las células madre que conforman el torrente sanguíneo en la médula ósea. Las leucemias mieloides son cánceres que surgen de células madre mieloides, las cuales maduran a eritrocitos, leucocitos y células productoras de plaquetas. Las leucemias linfoblásticas, por su parte, surgen de células derivadas de la célula madre linfocítica, la cual madura a linfocitos B y linfocitos T. Por tanto las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades de características biológicas y clínicas particulares (Ries et al., 1999). Los tipos de leucemias agudas hacen referencia a cánceres que surgen de células madres inmaduras, mientras que los tipos crónicos se refieren a aquellos que surgen de células madre maduras. El 95% de las leucemias son agudas y el 5% son crónicas. De las leucemias agudas el 75-80% son leucemias linfoides y el 20-25% son leucemias mieloides (Pui, 2009).

Mediante el uso de análisis convencional citogenético y molecular, las leucemias agudas se han reconocido como una enfermedad genética, que resulta de una serie de mutaciones adquiridas o heredadas en la estructura de ciertos genes (Rowley, 1999) Estas mutaciones son pasadas de la célula progenitora transformada a sus descendientes clonales. La mayoría de las aberraciones genéticas caen en grupos genéricos de desregulación funcional que subvierten los programas normales de desarrollo hematopoyético mediante la evasión del control del ciclo celular, la inhibición de la diferenciación, y la resistencia a la apoptosis terapéutica de los blastos leucémicos (Greaves, 1999).

Las características morfológicas e inmunofenotípicas definidas por la clasificación francesa-americana-británica (FAB) todavía representan el estándar de oro para la sub-clasificación de las leucemias mieloides agudas. Con base al compromiso de linaje y el grado de diferenciación de células blásticas, se conduce al reconocimiento de los ocho principales subgrupos de LMA (M0-M7) (Bennett et al., 1976).

A diferencia de la clasificación FAB de la LMA, la de LLA no ha mostrado tener inmunofenotipaje genético significativo y correlaciones clínicas, excepto para el subtipo L3. Por lo tanto, ha sido en gran parte substituido por esquemas inmunofenotípicos y genéticos (Bennett et al., 1976). La asignación de linfoblastos leucémicos a linajes específicos se ha hecho posible por el uso de anticuerpos monoclonales específicos (MAbs) de linaje y/o maduración, con lo cual el diagnóstico primario y sub-clasificación de LLA actualmente descansa en el inmunofenotipo (Ludwig et al., 1994), (Tabla 1). Por esta metodología se han identificado subgrupos con relevancia biológica y clínica dentro de los grupos mayores de LLA de precursores B y T (Ludwig et al., 1994).

Clúster de diferenciación (CD)	Características funcionales y moleculares	Reactividad celular dentro del sistema linfohematopoyético
Linaje T		
CD1a	Glicoproteína transmembranal tipo I, MHC 1 49 kDa	Timocitos cordicales, células Langerhans
CD2	Glicoproteína transmembranal tipo I, LFA 1, 50 kDa. Receptor para CD58	Células T tímicas y maduras, células NK
CD3	Complejo de 6 cadenas peptídicas, componente de TCR	Células T tímicas y maduras
CD4	Glicoproteína transmembranal tipo I, receptor para MHC clase II, 55 kDa	Timocitos y células T maduras (*helper/inducer*) monocitos, macrófagos
CD5	Glicoproteína 67 kDa, receptor *scavenger* rico en cisteína (SRCR)	Células T tímicas (débil) maduras (fuerte), subpoblaciones de células B maduras
CD7	Glicoproteína 40 kDa	Células T y NK. Células madre hematopoyéticas
CD8	Homodimero Aα o Heterodimero αβ. Correceptor con TCR de MHC	Subpoblaciones de timocitos y células T maduras (supresores/citotóxicos). Células NK
Linaje B		
CD19	Glicoproteína 95 kDa, asociada con CD2, traducción de señales	Expresión en linaje B de células precursoras a maduras. Células dendríticas foliculares.
CD20	Fosfoproteína 33-37 kDa, activación células B	Células B
CD22	Glicoproteína tipo I 135 kDa. Adhesión y señalización.	Células B precursoras y maduras
CD24	Glicosil fosfatidil inositol unido a glicoproteína 35-45 kDa	Células B precursoras y maduras, granulocitos neutrófilos.
CD79α	Glicoproteína 40-65 kDa, asociada con CD79α.	Células B precursoras y maduras. Células plasmáticas.

Tabla 1. Clúster de diferenciación para clasificar las leucemias linfoides agudas (Pui, 2003).

Los procedimientos actuales para el diagnóstico, la afiliación del linaje, y la caracterización de las etapas de maduración de LLA están basados en los patrones de expresión de antígenos en lugar de la presencia o ausencia de un solo antígeno (Tabla 2).

Categoría	Definición
LLA linaje B	CD19+ y/o CD79α+ y/o CD22+
Pro-B (B-I)	No expresión de otros antígenos de diferenciación
Común (B-II)	CD10+
Pre-B (B-III)	Citoplasmática IgM+
B madura (B-IV)	κ o λ+ citoplasmática o de superficie
LLA linaje T	CD3+ citoplasma/membrana
Pro-B (B-I)	CD7+
Pre-B (B-III)	CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
T cortical	CD1a+
T madura	CD3+ membrana, CD1a
α/β+ (grupo a)	Anti TCR α/β+
γ/δ+ LLA-T (grupo b)	Anti TCR γ/δ+

Tabla 2. Sub-clasificación de las leucemias agudas de linaje B y de linaje T (Pui, 2003)

4.2. Causas y factores de riesgo de LLA

Varios defectos genéticos recurrentes han sido identificados en las LLA, dentro de estos se encuentran, translocaciones cromosómicas, deleción y amplificación génica y mutaciones puntuales. Entre las alteraciones más comunes se encuentra la formación de proteínas quiméricas como BCR-ABL y MLL-AF4, defectos en las vías de señalización NOTCH y en genes HOX (Graux, 2011). Estas anormalidades genéticas somáticas tienen importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas, y se ha establecido que mutaciones cooperativas son necesarias para generar la leucemia y contribuir al desarrollo de resistencia farmacológica (Pui et al., 2011).

Dentro de los factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de leucemias en niños se encuentran la exposición a radiaciones ionizantes, pesticidas e hidrocarburos en distintos momentos de la concepción, el uso de alcohol y de sustancias psicoactivas en la madre gestante. La evidencia a la fecha no sugiere que la exposición parental o la exposición en la vida postnatal a agentes químicos, pueda explicar la mayoría de leucemias pediátricas (Piñeros et al., 2007).

4.3. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico precoz o detección pre-sintomática en leucemias agudas pediátricas es inexistente debido a que la enfermedad se encuentra diseminada en el organismo y cuando es sospechada se encuentra en la etapa sintomática, donde generalmente ya es posible establecer el diagnóstico clínico (Fajardo, 2005). Se considera como un caso confirmado de LLA pediátrica un niño menor de 15 años con aspirado o biopsia de médula ósea donde el 25% o más de las células nucleadas son blastos linfoides (Piñeros et al., 2008).

A partir del diagnóstico por aspirado de médula ósea o mielograma, se puede dar inicio al tratamiento. Sin embargo, el diagnóstico completo requiere exámenes de citogenética para identificar el cariotipo y exámenes de inmunofenotipo. Aunque existen muchos regímenes de tratamiento, se destacan dos clases: el tratamiento específico y el tratamiento de soporte (©Ministerio de Salud y Protección Social – Colciencias Guía de Práctica Clínica de leucemias. 2013 Guía No.9)

El tratamiento de soporte busca corregir las alteraciones secundarias a la leucemia como infecciones, sangrado, anemia y disfunción hepática. El tratamiento específico es bastante complejo y varía de 40 semanas para LMA a 104 semanas para LLA. Debe ser de estricto cumplimiento y conlleva un riesgo importante de rechazo, incumplimiento y abandono que afecta la supervivencia (Piñeros et al., 2008).

El manejo de las leucemias agudas se realiza a todos los pacientes independientemente del riesgo. En cada etapa se hace una anotación especial dirigida según riesgo y se divide el tratamiento en

dos fases principales, la inducción y la post-inducción. (©Ministerio de Salud y Protección Social – Colciencias Guía de Práctica Clínica de leucemias. 2013 Guía No.9)

Para entrar y mantener remisión de la enfermedad, todos los pacientes con diagnóstico de LLA requieren de la adherencia a un protocolo de quimioterapia, que incluye los cuatro elementos principales establecidos en la mayoría de los grupos cooperativos internacionales de investigación, consolidación, reinducción, profilaxis a sistema nervioso central y la terapia de mantenimiento (Pui et al., 2009).

La inducción, como su nombre lo indica consiste en inducir la eliminación a través de medicamentos de por lo menos 95% o más de las células malignas en la médula ósea, sitio de producción de las células sanguíneas (Escherich et al., 2010).

La post-inducción es la etapa de tratamiento que sigue a la fase de inducción y luego de lograr la remisión o sea de lograr la desaparición de las células neoplásicas. Se define como uno o más períodos de tratamiento intensificados administrados después de la inducción cuyo objetivo es mantener la remisión leucémica continuada y limitar un nuevo crecimiento de células malignas resistentes a los antineoplásicos (Escherich et al., 2010). La terapia de post-inducción varía según la asignación de grupos de riesgo (Pui et al., 2009). La post-inducción incluye la radioterapia craneal utilizada en algunos casos específicos. De acuerdo al protocolo establecido algunas de estas fases se repiten secuencialmente (Arico et al., 2010).

4.4. Incidencia y mortalidad

A nivel mundial se estima que las leucemias constituyen cerca del 30% de los cánceres que afectan la población infantil, de las cuales más del 75% son LLAs (Belson et al., 2007). En el continente americano comparado con los demás continentes, los niños presentan un riesgo incrementado de leucemia. En Suramérica, Colombia tiene junto con Ecuador las tasas de incidencia más altas con 6 casos nuevos por 100.000 menores de 15 años (Ferlay et al., 2002). De las defunciones por cáncer en menores de 15 años registradas en Colombia en 2005, 45% correspondieron a leucemias (Piñeros et al., 2007).

En países desarrollados el impacto de los tratamientos ha sido contundente con una tendencia significativa al descenso en las tasas de mortalidad. En Estados Unidos los avances en el tratamiento de las leucemias han llevado a tasas de curación del 70-85% (Pui et al., 2011). La razón incidencia/mortalidad para el año 2002 en Estados Unidos fue de 5,1 y en Colombia de 1,3, lo que muestra una alta letalidad (Piñeros et al., 2008). Los datos más actualizados en Colombia, según un análisis de las muerte ocurridas entre 2008 y 2010 por leucemias agudas (LLA y LMA) en el Instituto Nacional de Cancerología, se encontró que de 24 defunciones 87.5% fueron a causa de LLA con una edad promedio de 10,5 años. De estas, 83,3% se consideraron no evitables dadas las condiciones clínicas de la enfermedad (Vera et al., 2012).

4.5. La complejidad del plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo contiene carbohidratos, lípidos, sales, ácidos nucleicos y proteínas, entre otros. La concentración de proteínas puede alcanzar aproximadamente 75 mg/mL, producto de la contribución de proteínas de diversos tejidos que terminan en el plasma sanguíneo a través del sistema linfático (Okutucu et al., 2007). La proteína transportadora albúmina es la proteína predominante con 45-50% de la concentración total de proteínas, mientras que la inmunoglobulina G y la transferrina contribuyen entre el 8-20% y 3-7% respectivamente (Putnam, 1975). En contraste, otras proteínas derivadas de diversos procesos del cuerpo se encuentran altamente diluidas en el plasma (Surinova et al., 2011). Así, las proteínas en alta abundancia enmascaran la presencia de aquellas en baja abundancia que pueden tener potencial uso como biomarcadores de enfermedad disminuyendo su concentración relativa. Aunque los cambios en las proteínas de alta abundancia pueden también ser un indicativo del estado fisiológico de un organismo (Roche et al., 2008), usualmente proteínas de baja abundancia derivadas por ejemplo de tejidos, son responsables de cambios que pueden indicar un estadio temprano de enfermedad (Tirumalai et al., 2003). Aunque el plasma es de fácil obtención, el rango de concentración de proteínas que abarca de picogramos a miligramos por mililitro, es el mayor desafío de la proteómica del plasma.

Numerosas técnicas han sido empleadas para reducir la complejidad del proteoma del plasma, entre ellas se encuentran los métodos clásicos como centrifugación o extracción con solventes orgánicos (Mostovenko et al., 2012). Sin embargo, la depleción de las proteínas más abundantes (Chen et al., 2005), y el enriquecimiento no especifico de proteínas de baja abundancia vía librerías combinatorias de péptidos (Guerrier et al., 2007) han sobresalido como estrategias para la reducción de la complejidad.

La inmunodepleción es eficiente en la disminución de proteínas abundantes seleccionadas, sin embargo, el uso de condiciones nativas conlleva que otras proteínas de baja abundancia puedan unirse de manera inespecífica a proteínas como la albúmina, siendo entonces depletadas (Surinova et al., 2011). Un ejemplo de separación por columnas de inmunoafinidad, son las conocidas como ProteoPrep® de Sigma-Aldrich. Estas columnas contienen una mezcla de dos anticuerpos recombinantes de cadena sencilla unidos a un soporte, la remoción según reportan los fabricantes es de más del 95% de albúmina y 85% de inmunoglobulina G (IgG).

Por otra parte las librerías peptídicas de enriquecimiento de proteínas de baja abundancia consisten en una amplia y diversa librería de hexapéptidos unidos a un soporte cromatográfico (Boschetti, 2008), como por ejemplo la tecnología ProteoMiner™ de Bio-Rad. En teoría cada único hexapéptido se une a un sitio de reconocimiento único de proteína. Al pasar la muestra, las proteínas de alta abundancia saturan sus ligandos y el exceso de ellas es lavado de la columna. En

contraste las proteínas de baja abundancia son concentradas en sus ligandos específicos. Como resultado se disminuye el rango dinámico de las proteínas del plasma sanguíneo (Boschetti, 2008).

4.6. Electroforesis bidimensional

El estudio de mezclas complejas de proteínas como el plasma sanguíneo requiere el uso de técnicas de separación que permitan su análisis. Las técnicas basadas en cromatografía y en electroforesis son los dos tipos de acercamientos típicos para este fin. La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es una técnica robusta, reproducible y de alta resolución. Esta se basa en separación ortogonal, en donde las proteínas son primero separadas en base a su carga neta (pH dependiente) por enfoque isoeléctrico (IEF) y después separadas de acuerdo a su MW por electroforesis en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Ambos procesos se llevan a cabo en geles de poliacrilamida (Garfin, 2003).

En el IEF, las proteínas son separadas por electroforesis en un gradiente de pH, cada proteína se acumula o enfoca en su punto isoeléctrico (pI), definido como el pH al cual la carga neta de la proteína es cero. Este procedimiento anteriormente se realizaba mediante geles en capilares, en los cuales se generaba el gradiente de pH mediante la carga de anfolitos (compuestos anfóteros sintéticos). No obstante, debido a la pobre reproducibilidad de este método ahora se acepta ampliamente el uso de gradientes de pH inmovilizados (IPGs). En estos últimos, el gradiente de pH es generado por medio de compuestos buffer que son covalentemente unidos en los poros del gel de poliacrilamida (Righetti, 2013). El gradiente de pH permanece estable durante largos periodos de tiempo a altos voltajes, requisito para separaciones de alta resolución. Los IPGs son puestos en hojas plásticas mecánicamente estables y cortadas en tiras de mejor manipulación. Estas tiras IPGs están disponibles comercialmente en diferentes rangos de pH y longitud permitiendo flexibilidad y reproducibilidad en la primera dimensión de separación (Garfin, 2003).

4.6.1. Preparación de las muestras para 2DE.

Las proteínas se extraen de su material fuente por un bien establecido método de ruptura celular o por precipitación en el caso de proteínas en suspensión como en el plasma, las proteínas son entonces desnaturalizadas y solubilizadas mediante agentes caotrópicos, detergentes y agentes reductores. Agentes caotrópicos como la urea y la tiourea son compatibles con IEF y ellos son usados en alta concentración para romper estructuras de puentes de hidrógeno en la muestra. Detergentes no iónicos o zwiterionicos son usados para romper interacciones hidrofóbicas, por ejemplo CHAPS y Tritón X-100. Agentes reductores como ditiotreitol (DTT) y tributil fosfina (TBP) reducen los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína. Una buena solución de solubilización para la mayoría de los propósitos consiste de urea 8M, CHAPS 4%, 2mM TBP o 50mM de DTT y 0,2% (p/v) de carga de anfolitos (Garfin, 2003).

4.6.2. Visualización de proteínas en geles bidimensionales

La visualización de las proteínas separadas en geles bidimensionales se obtiene mediante técnicas de tinción. A pesar de la amplia diversidad de técnicas específicas de tinción, la gran mayoría de geles 2DE-PAGE son teñidos con azul de Coomassie G250 (CBB), tinción con plata o tinción fluorescente. CBB tiene la capacidad de formar complejos con ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina proporcionando una sensibilidad de detección de proteínas entre 200-500ng proteína por *spot* (Görg et al., 2004). Una modificación al procedimiento clásico consiste en una dispersión coloidal de CBB, que reduce considerablemente su límite de detección entre 8-50ng (Neuhoff et al., 1988). Entre las principales ventajas de este método están que no producen un fondo muy intenso, su fácil aplicación y desteñido del gel en agua siendo amigable con el ambiente. La tinción con plata tiene mayor sensibilidad que el CBB (límite de detección debajo de 0,1ng proteína por *spot*), sim embargo la tinción con plata es poco estequiometrica y menos reproducible que CBB debido a su punto final subjetivo, además por lo general son métodos laboriosos y complejos. La tinción con plata utiliza fijantes y sensibilizadores que contienen aldehídos, lo cual los hace más sensibles pero no permiten su subsecuente análisis por MS debido a entrecruzamiento covalente con las proteínas. Se han desarrollado métodos de tinción compatibles con MS omitiendo estos compuestos en la solución de fijado, sin embargo esto ha afectado su sensibilidad. (Yan et al., 2000; Görg et al., 2004).

4.7. Análisis de imágenes

Después de la tinción de los geles bidimensionales se debe hacer la documentación de los geles con el propósito de analizar mediante algún programa de análisis de imágenes posibles diferencias entre los geles pertenecientes a condiciones biológicas diferentes. El programa de análisis de imágenes es el corazón de la investigación proteómica en 2DE, aunque los geles pueden analizarse visualmente, la comparación y cuantificación objetiva de un gran número de *spots* de proteínas requieren asistencia de computación. Para mejores resultados cuantitativos, la imagen debe ser tomada por el programa de análisis, para geles 2DE de cualquier tamaño, en una resolución de 100 a 150 µm. El programa define y cuantifica *spots* en geles 2DE, remueve patrones de ruido de fondo, empareja imágenes de geles relacionados, compara la intensidad de *spots* correspondientes en geles comparativos y puede exportar información del gel a bases de datos (Garfin, 2003).

El análisis de imágenes permite seleccionar los *spots* para análisis por MS. La escisión puede hacerse de manera manual o automática. 2DE es particularmente valiosa en el análisis de la expresión diferencial. Un apropiado análisis diferencial utiliza grupos de 3 a 6 réplicas para cada condición estudiada. El programa de análisis promedia las variaciones inter-geles y compara las imágenes compuestas de cada replica de un grupo determinado (Garfin, 2003).

4.8. Espectrometría de masas en proteómica

Después de la separación por 2DE se puede identificar la identidad de los *spots* de proteína de interés, lo siguiente es la conversión de la proteína o proteínas del *spot* en una serie de péptidos usando proteasas específicas de secuencia. La identificación de péptidos es más sensible y eficiente que la identificación de proteínas completas. Con muy pocas excepciones la tripsina se utiliza para convertir las proteínas en péptidos; tripsina es una proteasa estable y agresiva, la cual corta las proteínas de manera específica en la región carboxilo terminal de residuos de arginina y lisina. Esto genera péptidos de masa más adecuada para secuenciación y con un residuo básico en el extremo carboxilo terminal del péptido (Steen et al., 2004).

Las mediciones de espectrometría de masas se realizan en fase gaseosa de analitos ionizados. Por definición un espectrómetro de masas consiste en una fuente de ionización, un analizador que mide la relación masa carga (m/z) de los analitos ionizados y un detector que registra el número de iones de cada valor m/z. Ionización por electrospray (ESI) e ionización por desorción asistida por una matriz (MALDI) son las dos técnicas más comúnmente usadas para volatilizar e ionizar las proteínas y péptidos para análisis por MS (Fenn et al., 1989). MALDI sublima e ioniza las muestras más allá de la matriz seca y cristalina que la contiene mediante pulsos laser. MALDI-MS es normalmente usada para analizar mezclas de péptidos relativamente simples mientras que la integración de la cromatografía liquida a ESI-MS (LC-MS) se prefiere para el análisis de muestras complejas. (Aebersold et al., 2003)

El analizador de masas es el punto central en el espectrómetro de masas y en el contexto de la proteómica define parámetros como la sensibilidad, la resolución y la exactitud de masa. (Aebersold et al., 2001). Hay cuatro tipos básicos de analizadores de masas comúnmente usados en proteómica: la trampa de iones (IT), el tiempo de vuelo (TOF), el cuádruplo (Q) y el ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FT-MS). Todos ellos son diferentes en diseño y rendimiento, cada uno con sus ventajas y limitaciones. Estos analizadores pueden trabajar solos o en algunos casos funcionar juntos en tándem para ganar ventaja de las fortalezas de cada uno (Aebersold et al., 2003).

MALDI es usualmente acoplado a analizadores TOF que miden la masa de péptidos intactos, mientras que ESI suele ir acoplado a trampas de iones e instrumentos de triple cuadrúpolo para generar espectros de fragmentos de iones de precursores iónicos seleccionados (espectrometría de masas en tándem ESI-MS/MS) (Aebersold et al., 2001). Más recientemente nuevas configuraciones de fuentes de ionización y analizadores se han desarrollado para permitir la fragmentación de precursores iónicos generados por MALDI mediante la configuración MALDI-TOF/TOF (Medzihradszky et al., 2000).

Debido a su simplicidad, exactitud de masa, alta resolución y sensibilidad MALDI-TOF continua siendo usado para identificar proteínas mediante mapeo peptídico o mapeo de la huella peptídica. En este método, las proteínas son identificadas por emparejamiento con una lista de masas de péptidos experimentales con la lista calculada con todas las masas de péptidos en una base de datos

de proteínas. Debido a que el mapeo de masa requiere una alta pureza de la proteína específica, esta técnica es comúnmente usada en conjunto con fraccionamiento previo mediante electroforesis en una o en dos dimensiones. La adición de la capacidad de secuenciación al método MALDI o ESI-MS/MS puede hacer la identificación de proteínas más especifica que la obtenida por el simple mapeo de la huella peptídica (Aebersold et al., 2003).

Los péptidos dentro del espectrómetro de masas son analizados en el primer analizador donde se determina su valor m/z y la intensidad de todos los picos del espectro, el espectrómetro de masas entonces procede a obtener la estructura primaria (secuencia) de estos péptidos. En la espectrometría de masas en tándem un ion peptídico particular es separado, se imparte energía por colisión con un gas inerte (Argón o Helio) y esta energía permite que el péptido se fragmente generando un espectro de masas de los fragmentos resultantes. Las especies que son fragmentadas se denominan precursores iónicos y los iones resultantes del tándem se denominan productos iónicos. En teoría es posible armar la secuencia de todos los péptidos para una proteína a partir de sus productos iónicos, lo que se denomina secuenciación de *novo*, sin embargo muchas veces la información del espectro en tándem no es completa y su análisis puede ser confuso y tedioso(Steen et al., 2004). Esto ha sido solucionado por la bioinformática como se comenta a continuación.

A principio de los años 1990s los investigadores cayeron en cuenta que el problema de la secuenciación de péptidos podía ser convertido en un problema de correspondencia contra bases de datos, el cual sería mucho más simple de solucionar. La búsqueda en bases de datos disminuye el tiempo de análisis basado en que únicamente una fracción infinitesimal de una posible secuencia de aminoácidos de un péptido realmente ocurre en la naturaleza. Un espectro de fragmentación de un péptido podría entonces no contener suficiente información para de forma no ambigua derivar la secuencia completa de aminoácidos, pero podría tener suficiente información para hacer correspondencia a una secuencia peptídica única en una base de datos en base a los fragmentos iónicos observados y esperados para dicho péptido. Existen varios algoritmos que son usados para búsqueda de secuencias en bases de datos con espectros de masas en tándem, por ejemplo PeptideSearch, Sequest, Mascot, Sonar MS/MS y ProteinProspector. La identificación de péptidos puede ser reportada en términos de un puntaje de probabilidad como en el motor de búsqueda Mascot® (Mann, 1996). Una limitación de la búsqueda en bases de datos en comparación con la secuenciación de *novo* es que únicamente puede hacerse correspondencia de espectros en tándem con organismos cuyo genoma se encuentre secuenciado, de manera que es posible predecir todos los péptidos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Establecer diferencias en los perfiles de los proteomas plasmáticos de un grupo de niños diagnosticados con leucemia linfoide aguda tipo B y de un grupo de niños sanos, que sirvan de base para la búsqueda de potenciales biomarcadores para el diagnóstico de esta enfermedad.

5.2. Objetivos específicos

1. Aplicar estrategias para reducir la complejidad del plasma sanguíneo que permita su caracterización mediante electroforesis bidimensional.
2. Determinar las condiciones óptimas de 2DE para la obtención de proteomas plasmáticos de niños.
3. Obtener el perfil proteico de plasma sanguíneo y de médula ósea de muestras de leucemia linfoide aguda tipo B, antes y después del tratamiento de inducción a remisión clínica y de un grupo control sano.
4. Identificar posibles diferencias en los proteomas plasmáticos de los grupos estudiados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental empleada consistió en primer lugar en la implementación de una metodología para la obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo, una vez establecidas, se hizo análisis comparativo de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B.

Este trabajo conto con el aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología (INC). Para el uso de muestras de menores de edad en este trabajo, se debió contar con autorización de los padres o representantes legales mediante la firma del respectivo consentimiento informado (Anexo1) aprobado por el mismo comité.

6.1. Obtención de las muestras de plasma sanguíneo

6.1.1. Selección de potenciales sujetos de estudio

Criterios de inclusión.

- Niños y niñas entre 1 y 10 años, con diagnóstico de LLA, que no hayan iniciado tratamiento y cuyos padres o representantes legales acepten voluntariamente que ellos participen en el estudio.
- Niños y niñas entre 1 y 10 años, considerados como sanos cuyos padres o representantes legales acepten voluntariamente que ellos participen en el estudio.

Criterios de exclusión.

- Niños con otra enfermedad crónica diferente a la LLA.
- Niños que no vayan a realizarse el tratamiento en el Instituto Nacional de Cancerología.

6.1.2. Descripción de las intervenciones

- Administración del consentimiento informado (Anexo 1)
- Recolección de información en el formulario de recolección de información (Anexo 2).
- Para los pacientes: toma de 4mL de sangre periférica en un tubo con anticoagulante K_3EDTA, mediante venopunción realizada en salas de cirugía durante la realización del aspirado de médula ósea. Esto se realizara antes del inicio del tratamiento y una vez finalizada la fase de inducción.
- Para los niños control se tomara 4mL de sangre periférica en un tubo adicional con anticoagulante K_3EDTA, mediante venopunción realizada durante toma de muestra para exámenes de sangre.

6.1.3. Obtención del plasma sanguíneo

- Las muestras de sangre deben ser inmediatamente centrifugadas a 1300xg por 10 minutos a 2-6ºC.
- Mientras las muestras se centrifugan se realizara la marcación y pre-enfriamiento de tubos de 1,8 mL para posteriores centrifugaciones (2 tubos) y la alícuotas finales (8 tubos).
- Posterior a la centrifugación, se recupera el plasma en dos tubos de 1,8 mL. las muestras de plasma se centrifugan 2400xg por 15 minutos a 2-6ºC para remover el material celular remanente y obtener el plasma pobre en plaquetas.
- El plasma pobre en plaquetas se alícuota en tubos de 1,5 mL previamente marcados (aproximadamente 8 alicuotas de 250µL)
- Las alícuotas de plasma sanguíneo se almacenan inmediatamente a -70C.

6.2. Reducción de la complejidad del plasma sanguíneo

Debido a la alta complejidad de proteínas que componen el plasma sanguíneo que dificulta su caracterización mediante electroforesis, se debe reducir su complejidad disminuyendo el rango dinámico de proteínas del plasma mediante la reducción de proteínas de alta abundancia o concentración de proteínas de baja abundancia de manera que se preserve la fracción de mayor interés para la búsqueda de biomarcadores. En este trabajo se ensayó la inmunodepleción de albúmina e IgG y el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia.

6.2.1. Inmunodepleción de albúmina e inmunoglobulina G

Se utilizó el estuche comercial ProteoPrep® (Immunoafinity Albumin and IgG Depletion kit, Sigma-Aldrich), el cual ha sido diseñado para remover específicamente albúmina e IgG de suero humano (25-50µL) en la preparación de muestras para análisis proteómico por 2DE o LC. El medio pre-empacado en las columnas ProteoPrep® es una mezcla de dos resinas que contienen anticuerpos recombinantes específicos de cadena sencilla. El procedimiento se siguió de acuerdo a las recomendaciones dadas por los fabricantes. (Ver protocolo en Anexo 3) *(http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/protiabul.pdf)*

6.2.2. Enriquecimiento de proteínas de baja abundancia

Se utilizó el estuche comercial de enriquecimiento de proteínas de baja abundancia ProteoMiner™ (Protein Enrichment kit, Small Capacity. Bio-Rad). La tecnología ProteoMiner™ es na herramienta de preparación de muestras para la compresión del rango dinámico de concentración de proteínas en muestras biológicas complejas. Esta tecnología utiliza una amplia y muy diversa librería combinacional de ligandos inmovilizados. Cuando se aplica la muestra biológica compleja las proteínas en alta abundancia saturan sus ligandos de alta afinidad y el exceso es lavado de la columna. En contraste las proteínas de abundancia media y baja son concentradas en

sus ligandos específicos. El procedimiento se siguió de acuerdo a las recomendaciones dadas por los fabricantes. (Ver protocolo en Anexo 3)
(http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010636D.PDF)

6.3. Cuantificación de proteínas por ácido bicinconínico (BCA)

Se utilizó el estuche comercial Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific; Número de catálogo 23225). La cuantificación de proteínas por BCA combina la bien conocida reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas en medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del ion cuproso (Cu^{1+}) por el ácido bicinconínico. El color purpura resultante se midió a 570 nm. El estuche se utilizó de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (*https://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf*).

6.4. Precipitación de proteínas

En este trabajo se utilizó la precipitación a través de 3 metodologías basadas en la precipitación de proteínas por solventes orgánicos.

Principio de precipitación por solventes orgánicos: Las proteínas se mantienen disueltas en fase acuosa gracias a que el agua minimiza las atracciones electrostáticas entre las proteínas. Las moléculas de agua reducen la fuerza de atracción electrostática por un factor de 8,0 (la constante dieléctrica del agua a 0ºC). El solvente orgánico reduce la constante dieléctrica del agua durante la precipitación, minimizando la capacidad de solvatación del agua. Al aumentar la concentración del solvente provoca un desplazamiento de las moléculas de agua, lo que permite fuertes interacciones hidrofóbicas entre las proteínas que causa su agregación y precipitación (Scopes, 1994)

Se siguieron los siguientes protocolos establecidos en el grupo de Investigación en Hormonas (Novoa, 2013).

6.4.1. Precipitación con acetona

1. Tomar 1 volumen de muestra de plasma sanguíneo depletado
2. Agregar Cuatro volúmenes de acetona fría
3. Incubar a -20ºC durante toda la noche
4. Centrifugar a 12 000xg por 15 minutos a 4 ºC
5. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet
6. Suspender el pellet en un buffer de rehidratación para el enfoque isoeléctrico.

6.4.2. Precipitación con ácido tricloroacetico – acetona

1. Tomar 1 volumen de muestra de plasma sanguíneo depletado
2. Adicionar 1/10 volumen de ácido tricloroacetico (TCA) concentrado de manera que la concentración final sea 10%.
3. Mezclar e incuba durante 1 hora a 0ºC
4. La muestra se centrifuga a 12000 rpm por 15 minutos a 4ºC y se descarta el sobrenadante

5. Lavar el pellet con acetona fría y centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos a 4ºC. Repetir una vez
6. Lavar el pellet con una solución acetona-agua (90:10) y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a 4ºC
7. Dejar secar el pellet y suspender en buffer de solubilización para el enfoque isoeléctrico.

6.4.3. Precipitación con metanol – cloroformo

1. Tomar 1 volumen de muestra de plasma sanguíneo depletado
2. Agregar 4 volúmenes de metanol y un volumen de cloroformo y mezclar por vortex
3. Adicionar 3 volúmenes de agua milli Q y mezclar por vortex
4. Centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos a 4ºC
5. Remover La fase acuosa (superior)
6. Añadir 4 volúmenes de metanol
7. Centrifugar a 12000rpm por 2 minutos a 4ºC
8. Remover La fase acuosa sin perturbar el pellet
9. Dejar secar el pellet y se suspende en buffer de solubilización para el enfoque isoeléctrico.

6.5. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS se utilizaron para analizar los perfiles proteicos del plasma completo y de los plasmas tratados con los diferentes métodos de fraccionamiento. Brevemente, 25 µg de proteína en cada caso se trataron con buffer carga en condiciones reductoras con DTT 100 mM. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida de 12% o en gradiente del 5%-15% a 80V. Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie coloidal G-250.

6.6. Electroforesis bidimensional

Se siguieron los siguientes protocolos establecidos en el grupo de Investigación en Hormonas (Novoa, 2013).

6.6.1. Primera dimensión: enfoque isoeléctrico

Para el enfoque isoeléctrico se emplearon tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPGs) de 7cm, pH 3-10 rango lineal (Bio-Rad). 100µg de proteína se precipitaron mediante el método TCA/acetona y se disolvieron en buffer de rehidratación con urea/tiourea. Alternativamente, se emplearon tiras de 18cm pH 3-10 rango lineal (Bio-Rad). Estos últimos permiten una mayor cantidad de carga de proteína entre 500 µg -1000 µg.

El enfoque isoeléctrico se llevó a cabo en un equipo IEF Cell (Bio-Rad). El protocolo utilizado para el enfoque de proteínas del plasma sanguíneo fue optimizado (paso de enfoque) tomando como base el protocolo estándar utilizado para proteínas de extractos celulares descrito a continuación:

1. Rehidratación pasiva 1 hora sin corriente
2. Rehidratación activa 11 horas a 50V

3. Rampa rápida: 200V por 1 hora, 500V por 1 hora, 1000V por 1 hora, 2000V por 1h
4. Paso de enfoque: 4000V en rampa rápida hasta acumular 12,000 V/h
5. Paso de seguridad: 500V por 5 horas en rampa lineal

Finalizado el enfoque isoeléctrico, las tiras IPGs se guardaron a -70ºC (máximo 15 días) hasta correr la segunda dimensión: electroforesis SDS-PAGE.

6.6.2. Segunda dimensión: Electroforesis SDS-PAGE

Las tiras IPGs se equilibraron con soluciones de DTT e iodoacetamida (IAA) cada una por 20 minutos bajo agitación suave. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Los geles se corrieron a rampa de voltaje: 80V por 40 minutos, 100V por 1 hora y 120V hasta que el frente de corrida alcanzara el límite del gel.

6.6.3. Visualización de proteínas en geles bidimensionales

La visualización de proteínas en los geles SDS-PAGE se realizó con azul de Coomassie coloidal G-250 de acuerdo al protocolo establecido en el grupo de investigación en Hormonas (Novoa, 2013). Alternativamente se utilizó la tinción con plata mediante el estuche *Silver Stain for Mass Spectrometry* de Pierce (Catálogo 24600), de acuerdo al protocolo establecido por los fabricantes (*https://www.piercenet.com/instructions/2161746.pdf*).

6.7. Análisis de imágenes

Las imágenes de los geles bidimensionales se obtuvieron a través del documentador de geles VersaDoc (Bio-Rad). Las imágenes se capturaron en escala de grises a una resolución adecuada mayor a 8 bits para el programa de análisis de geles bidimensionales. Se utilizó el programa Melanie 7.0 de GENEBIO (*http://www.genebio.com/products/melanie/*).

El análisis de imágenes se divide en 2 partes: 1) análisis de geles y 2) análisis de clases o grupos biológicos.

6.7.1. Análisis de geles

En esta etapa del análisis de imágenes el programa hace la detección de los *spots* de proteína en todos los geles independientemente a que grupo o clase pertenezca. Luego se hace el *match* entre todos los geles, en donde cada *spot* se alinea con sus semejantes en todos los geles, estas etapas se hacen de forma automática pero requieren de una curación manual para eliminar falsos *spots* o *match* incorrectos.

Al final de este proceso se obtienen tablas donde se resume el %*match* de todos los geles con respecto a un gel tomado como referencia. Adicionalmente se obtiene una gráfica de análisis de factores (factor analysis) la cual permite visualizar que tan parecidos o diferentes son los geles pertenecientes a las diferentes clases.

6.7.2. Análisis de clases

En esta sección los *match* en los geles pertenecientes a las diferentes clases se comparan de manera individual. El programa arroja una tabla en la cual se resume un número de identificación (*match ID*), el número de clases en las cuales cada *spot* hace *match* (*match count*), el cambio en la intensidad relativa (*fold*), y la significancia estadística dada por diferentes parámetros como ANOVA.

6.8. Espectrometría de masas

1. Obtención de *spots*: Los *spots* de interés fueron cortados del gel bidimensional de manera manual y trasferidos a un tubo eppendorf de 1,5 mL previamente lavados con metanol.
2. Lavado: Los *spots* se lavaron 3 veces con una solución de acetonitrilo 50% y bicarbonato de amonio 25 mM en agua milli Q para eliminar el azul de coomassie y restos de detergente.
3. Digestión tríptica: los geles se deshidrataron completamente con acetonitrilo al 100%, posteriormente se agregó tripsina en solución (20ng/µL) y se encubo por 18h a 37ºC.
4. Obtención péptidos trípticos: Los péptidos se extrajeron del *spot* posterior digestión por sonificacion y lavado con ácido fórmico 5%. los péptidos se concentraron hasta un volumen de 10 µL y finalmente se concentran mediante cromatografía reversa usando ZipTip® Pipette Tips (Merck Millipore).
5. Análisis por espectrometría de masas: La solución que contiene los péptidos se sembró en placa en presencia de matriz para análisis mediante espectrometría de masas en tándem en un equipo con configuración MALDI-TOF/TOF. los análisis de masas se hicieron en el Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, Brasil.
6. Identificación de proteínas La identificación de las proteínas se hizo por comparación con bases de datos mediante el motor de búsqueda Mascot®.

6.8.1. Identificación de proteínas por Mascot®

La lista de picos obtenidos se analizó en el motor de búsqueda Mascot® en la metoddologia Ion *search* (MS/MS). La búsqueda se hizo en la especie *Homo sapiens* y demás parámetros descritos en la Tabla 13 en la sección de resultados. Para obtener resultados confiables solo se tuvo en cuenta las proteínas identificadas por encima de la línea de corte (*threshold*) dada por el programa y por lo menos una cobertura de secuencia de 2 peptidos asignados a la proteína (#*match*)

7. RESULTADOS

7.1. Cuantificación total de proteínas en plasma sanguíneo y plasma de médula ósea

Se analizó el contenido de proteínas en las muestras controles correspondientes a niños sanos y en las muestras de los pacientes diagnosticados con LLA, se utilizó el método del método del ácido bicinconinico y patrón de proteína albúmina bovina sérica (BSA). Los resultados para 6 muestras de plasma sanguíneo de niños sanos (controles) se muestran en la tabla 3. Los resultados para 3 muestras de plasma sanguíneo de niños diagnosticados con LLA-B en la tabla 4, hay que aclarar que de las muestras de LLA-B, dos corresponden a un mismo paciente antes (LLA 3 inicio) y después (LLA 3 fin) del tratamiento de inducción.

Muestra	Concentración (mg/mL)
Control 1	77,86
Control 2	85,22
Control 3	84,79
Control 3	96,19
Control 5	71,80
Control 6	99,36
PROMEDIO	85,87
Desviación estándar	10,51
CV	0,1223

Tabla 3. Resultados de cuantificación de proteínas en plasmas sanguíneos de niños sanos.

Muestra	Concentración (mg/mL)
LLA 3 inicio	75,41
LLA 3 fin	72,24
LLA 6 inicio	69,78
PROMEDIO	72,48
Desviación estándar	2,821
CV	0,03893

Tabla 4. Resultados cuantificación de proteínas en plasma sanguíneo de niños diagnosticados con LLA-B.

7.2. Reducción de la complejidad de proteínas del plasma

7.2.1. Perfil electroforético de proteínas del plasma sanguíneo

Se obtuvo el perfil electroforético de proteínas del plasma sanguíneo mediante electroforesis SDS-PAGE y electroforesis bidimensional (Figura 1). El perfil electroforético SDS-PAGE muestra la presencia de bandas de proteína muy intensas que saturan el carril y no permite una buena separación de las bandas de proteína. De manera similar; el perfil electroforético bidimensional del plasma sanguíneo muestra la predominancia de *spots* de proteína muy intensas. La alta concentración de algunas proteínas en el plasma sanguíneo enmascaro la presencia de otras proteínas en menor abundancia y afecto la separación o resolución de los perfiles electroforéticos.

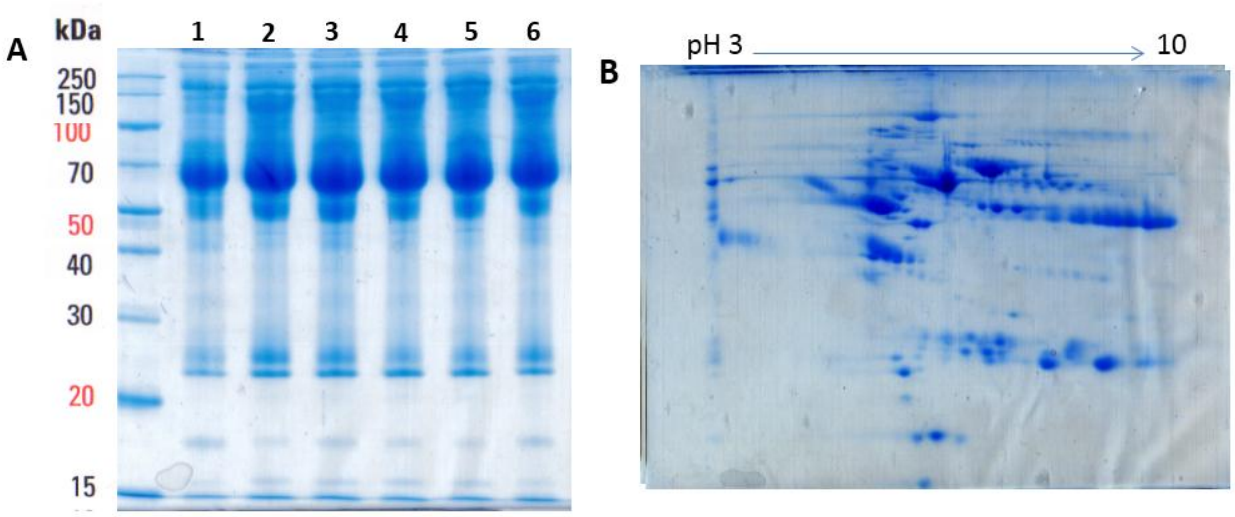


Figura 1. ***Perfil electroforético del plasma sanguíneo.*** **A.** Gel SDS-PAGE al 12% de 6 plasmas sanguíneos de niños sanos **B.** Gel bidimensional de una muestra de plasma sanguíneo de un niño sano.

Estos resultados plantearon la necesidad de reducir la complejidad de proteínas que componen el plasma, para este fin se ensayaran dos estrategias: la remoción de proteínas de alta abundancia y la concentración de proteínas de baja abundancia.

7.2.2. Cuantificación de proteínas en plasmas tratados con las columnas de ProteoPrep® y ProteoMiner™

La reducción de la complejidad de las proteínas del plasma sanguíneo se llevó a cabo mediante dos estrategias diferentes: 1) Concentración de proteínas de baja abundancia del plasma mediante el estuche comercial ProteoMiner™ y 2) La remoción de las dos proteínas más abundantes del plasma sanguíneo: albúmina e IgG mediante la metodologia ProteoPrep®.

Las dos estrategias empleadas para la reducción de la complejidad del plasma sanguíneo, funcionan como columnas de fraccionamiento, en las cuales se obtienen dos fracciones una de proteínas no retenidas y otra de proteínas retenidas. Para la columna ProteoPrep®, la fracción de proteínas no retenidas corresponde a proteínas de interés y se denominó plasma depletado, la fracción de proteínas retenidas corresponde a proteínas de alta abundancia (albúmina e IgG). En el caso de las columnas ProteoMiner™, la fracción denominada proteínas no retenidas corresponde a las proteínas que no se unen a los ligandos específicos de la columna y por tanto corresponde a proteínas en mayor abundancia relativa, la fracción de proteínas retenidas por la columna es el plasma enriquecido en proteínas de baja abundancia. Para ambos métodos se analizó el contenido de proteínas en ambas fracciones proteicas y además los lavados intermedios realizados para la obtención de cada fracción proteica, estos resultados se resumen en la Tabla 5. En la Tabla 6 se muestra los porcentajes de recuperación de cada fracción proteica en cada columna.

Muestra	concentración final (µg/µL)
Columna ProteoMiner™	
Fracción retenidas	5,32
Fracción no retenida	56,7
lavado 1	1,79
lavado 2	0,234
lavado 3	0,161
lavado 4	0,115
Columna ProteoPrep®	
Fracción no retenidas	4,44
Fracción retenida	9,56
Lavado 1	0,445
Lavado 2	0,241

Tabla 5. Contenido de proteínas en las distintas fracciones proteicas del plasma tratado con las columnas ProteoMiner™ y ProteoPrep®.

Una vez cuantificadas las fracciones proteicas resultantes de cada columna, se analizaron estas mediante electroforesis SDS-PAGE y electroforesis bidimensional con el fin de seleccionar la más adecuada para aplicar a las muestras de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B.

	ProteoMiner™			ProteoPrep®		
Concentración muestra	85,61 µg/µL			85,61 µg/µL		
Volumen carga:	200 µL			50 µL		
Total en masa:	17,12 mg			4,280 mg		
Fracción	Volumen recuperado	mg totales	Porcentaje	Volumen recuperado	mg totales	Porcentaje
Retenida	60 µL	319,5 µg	2%	300 µL	2867 µg	67%
No retenida	200 µL	11,34 mg	66%	225 µL	1000 µg	23%

Tabla 6. Porcentaje der recuperación de proteínas por las columnas ProteoMiner™ y ProteoPrep®.

7.2.3. Evaluación métodos reducción de la complejidad del plasma por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

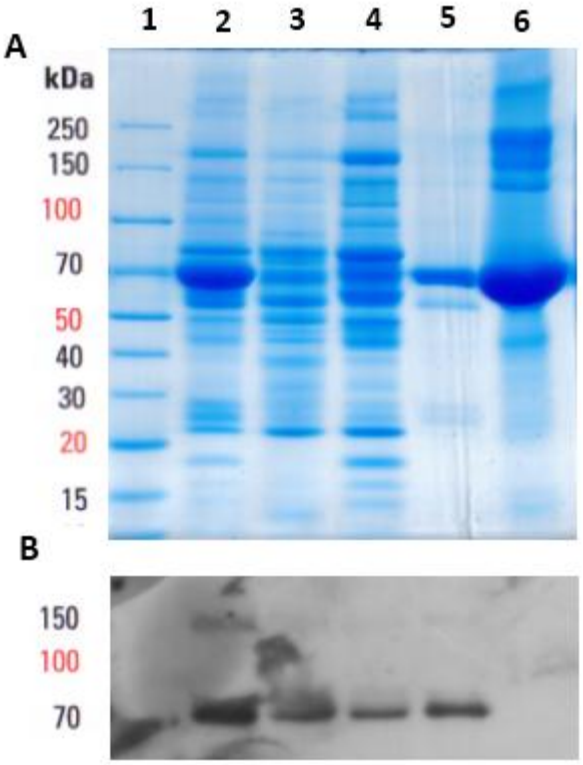


Figura 2. ***Evaluación de los métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por electroforesis SDS-PAGE*. A.** Gel en gradiente 5%-15% **1)**patrón de peso molecular **2)** plasma completo **3)** fracción retenida del plasma tratado con columna ProteoMiner™ **4)** fracción no retenida del plasma tratado con columna ProteoPrep® **5)** fracción retenida del plasma tratado con columna ProteoPrep® y **6)** patrón de albúmina humana. **B**. Western Blot contra IgG humana producida en conejo, Revelado por quimioluminiscencia sistema ECL (General Electric).

El plasma de una muestra de un niños sano y las fracciones proteicas retenidas y no retenidas de las columnas ProteoPrep® y ProteoMiner™ se corrieron en un gel de poliacrilamida entre el 5% al 15% en condiciones desnaturalizantes. Estos resultados se muestran en la Figura 2.

Los perfiles electroforéticos obtenidos del plasma completo y del plasma tratado con los dos sistemas, ProteoMiner™ y ProteoPrep®, permitieron apreciar que ambas metodologías generan una mejor separación de las proteínas del plasma en comparación al plasma sin tratamiento, el cual se encuentra saturado de unas pocas bandas muy intensas. Los perfiles electroforéticos del plasma tratado con las columnas resultaron ser completamente diferentes. En la fracción retenida de la columna ProteoMiner™ se observó la presencia de bandas intensas correspondientes a albúmina e IgG. La albúmina se observó como la banda de mayor intensidad alrededor de 70kDa (a la misma distancia que el patrón de albúmina humana corrido en el carril 6, Figura 2). Para la IgG se observaron 2 bandas que corresponden a las cadenas pesadas y ligeras; la presencia de IgG se confirmó mediante ensayo de Western blot (Figura 2B) evidenciándola en ambas fracciones de interés de las columnas ProteoMiner™ y ProteoPrep®, lo cual indica que esta no es removida por completo.

Para continuar con el trabajo se escogió el sistema de inmunodepleción ProteoPrep®, debido a que permite la caracterización del proteoma del plasma eliminando selectivamente proteínas de alta abundancia, metodología adecuada para este estudio de tipo observacional en donde la eliminación inespecífica de proteínas no es recomendable dada la intención de buscar diferencias que pueden llegar a ser sutiles en los perfiles proteicos entre casos y controles.

7.3. Selección de las condiciones óptimas para la electroforesis bidimensional

Para poder hacer una adecuada comparación entre los geles bidimensionales entre casos y controles estos deben ser corridos bajo las mismas condiciones experimentales que deben permitir obtener geles con adecuada resolución y reproducibilidad. En esta parte del trabajo se evaluó las condiciones que repercuten directamente en la obtención de geles bidimensionales. Entre estas se encuentra el método de precipitación de proteínas, la selección del buffer de rehidratación, el programa de enfoque isoeléctrico y el método de tinción para la visualización de *spots* de proteína en los geles. A continuación se muestra la evaluación de cada uno de ellas.

7.3.1. Selección del método de precipitación de proteínas

Después del fraccionamiento de proteínas del plasma y previo al enfoque isoeléctrico se requiere la precipitación de proteínas. El propósito de la precipitación de proteínas es remover contaminantes no proteicos como lípidos y sales que interfieren con el análisis 2DE (Shaw & Riederer, 2003).

Existen varios métodos para la precipitación de proteínas, los cuales tienen sus propias ventajas y desventajas. En este trabajo se evaluaron 3 de los métodos más conocidos y empleados para la concentración de proteínas de plasma sanguíneo: 1) precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

y acetona, 2) precipitación con acetona y 3) precipitación con metanol/cloroformo. La evaluación de los diferentes métodos de precipitación se hizo mediante electroforesis SDS-PAGE.

Los perfiles electroforéticos se muestran en la Figura 3. Las tres metodologías de precipitación cumplen el propósito de concentrar las proteínas del plasma. No obstante, en la precipitación con acetona fría (carriles 3 y 8) se observó una disminución en la intensidad y resolución de algunas bandas en el gel (ver delineamientos en rojo de la Figura 3). Entre la precipitación con TCA/acetona (carriles 4 y 9) y cloroformo/metanol (carriles 2 y 7), ambos perfiles mostraron similar número e intensidad de bandas de proteína. A pesar de ello, la precipitación con TCA/acetona mostró una mayor intensidad de bandas de proteína en la parte alta del gel (150-250kDa), por tanto se seleccionó este método de precipitación de proteínas para el análisis 2DE de las muestras de plasma sanguíneo. Nuestra elección coincide con reportes de literatura en los cuales se prefiere este método para la precipitación de proteínas del plasma sanguíneo, por su eficiente concentración de proteínas y desalado de las muestras de plasma (Ahmad et al., 2009).

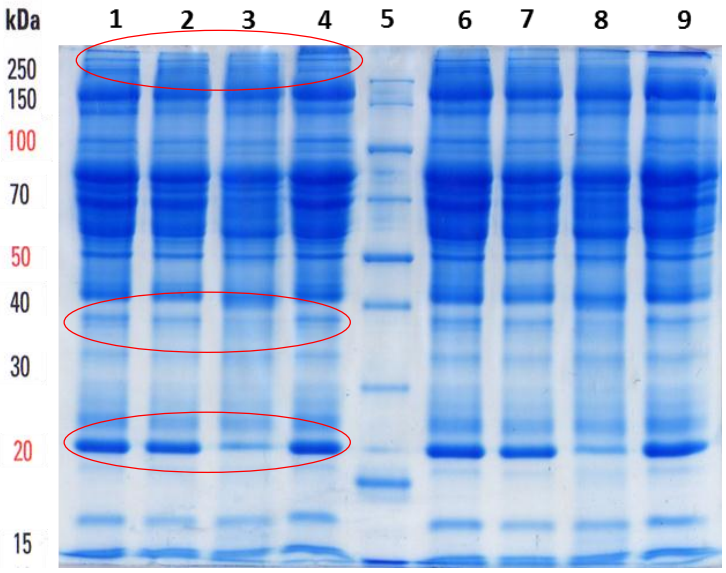


Figura 3. ***Evaluación métodos de precipitación de proteínas del plasmas después de la depleción por columna ProteoPrep®.*** Plasma depletado sin precipitar, carriles 1 y 6. Precipitación con TCA/acetona: carriles 4 y 9. Precipitación con Acetona: carriles 3 y 8. Precipitación con metanol/cloroformo: carriles 2 y 7. Patron de peso molecular: carril 5.

7.3.2. Selección del buffer de solubilización para el enfoque isoeléctrico

El papel del buffer de disolución para el enfoque isoeléctrico es la solubilización de las proteínas después de la precipitación, de manera que éstas se puedan separar de acuerdo a su punto isoeléctrico. La selección de un buffer adecuado es muy importante, buffer no apropiados pueden causar la pérdida de la muestra por una pobre solubilización de las proteínas. En este punto se evaluó la no precipitación de proteínas, o sea el acople directo de inmunodepleción al enfoque isoeléctrico (Figura 4 A y B) y el uso de dos buffer de disolución: uno que contiene solamente Urea 7M (Figura 4C) y el otro con la combinación de caotropos Urea 7M/Tiourea 2M (Figura 4D).

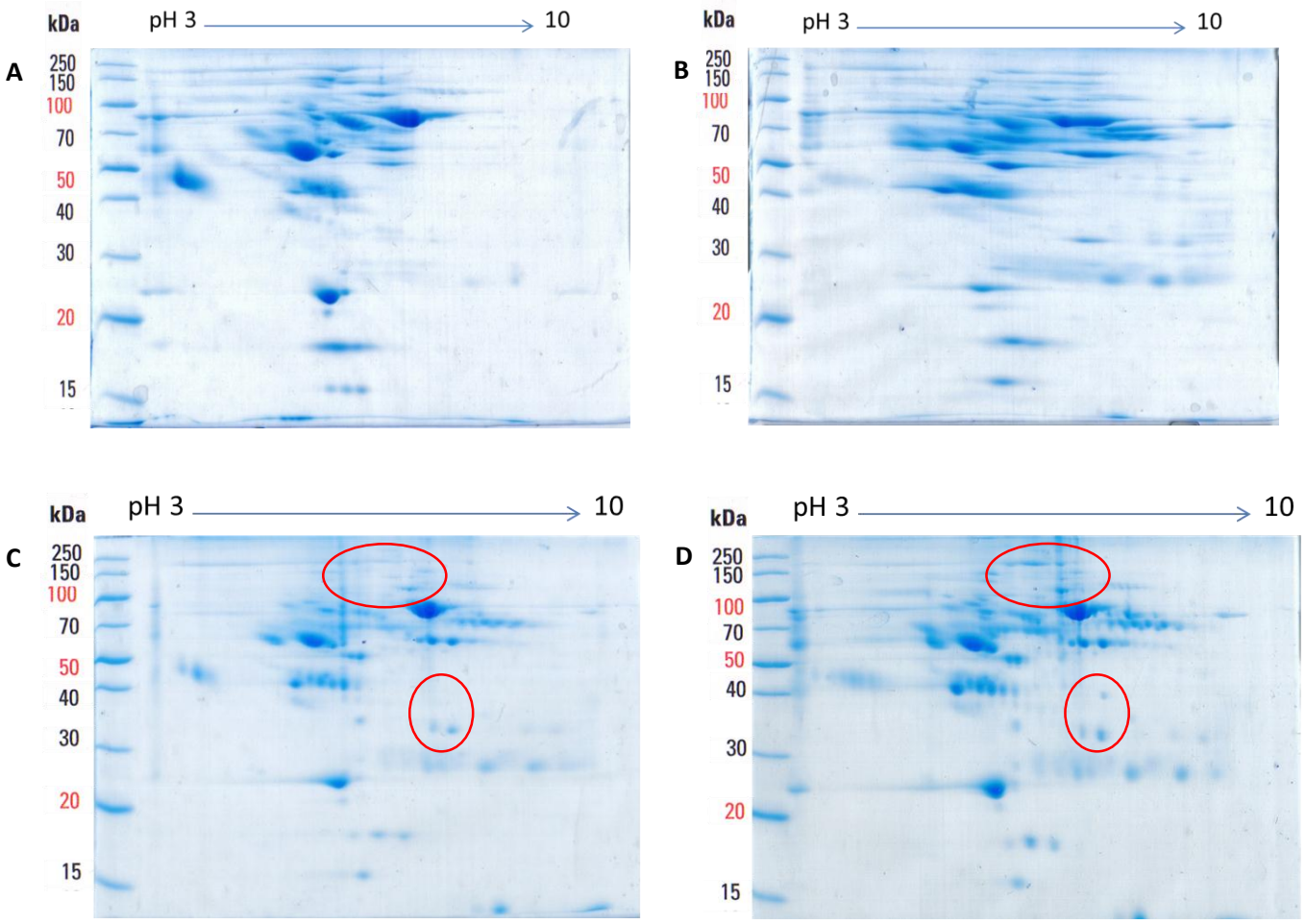


Figura 4. ***Efecto del buffer de disolución IEF en la separación de proteínas por 2DE.*** Acople directo entre inmunodepleción y enfoque isoeléctrico (A y B) y precipitación de proteínas seguida de disolución (C y D). **A**. Buffer de extracción de ProteoPrep® **B.** Buffer urea 7M/tiourea 2M **C.** Precipitación con TCA/acetona y disolución con buffer urea 7M y **D.** Precipitación con TCA/acetona y disolución con buffer urea 7M/tiourea 2M.

El acople directo entre la inmunodepleción y el enfoque isoeléctrico tendría las ventajas de evitar pérdidas de proteína durante la precipitación y posterior disolución de las mismas. Se ensayaron

dos buffers, el primero fue el buffer de extracción incluido en el estuche de inmunodepleción, el cual se reporta por los fabricantes contener: Urea 7M/Tiourea 2M (Figura 4A) y el segundo un buffer preparado en el laboratorio con igual concentración de urea y tiourea que la descrita por el estuche (Figura 4B). Las imágenes producidas en estas condiciones muestran pocos *spots* de proteína bien diferenciados, probablemente debido a un pobre enfoque. La razón más probable de esto es la presencia de componentes no proteicos que interfieren en el enfoque isoeléctrico, por ejemplo lípidos o exceso de sales (Son et al., 2003).

Se encontró una mejor resolución de *spots* luego de la precipitación de proteínas. Las imágenes de los geles bidimensionales precipitados con TCA/acetona y posterior solubilización con buffer urea se muestra en la Figura 4C y con el buffer alterno urea/tiourea en la Figura 4D. Entre los dos buffers ensayados se encontró que en los geles que contienen la combinación de caotropos urea/tiourea se incrementa el número de *spots* de proteína con respecto a los que contienen solo urea, lo que se correlaciona con una mejor solubilización de proteínas (ver delineamientos rojos en la Figuras 4C y 4D).

7.3.3. Optimización del programa de enfoque isoeléctrico

El programa de enfoque isoeléctrico es aquel que permite la separación de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, por tanto; la inadecuada aplicación de este podría ocasionar que las proteínas no se separen o enfoquen si no se aplica el voltaje suficiente o que las proteínas sufran una degradación por exceso de voltaje. Después de probar varios protocolos de enfoque tomando como base las recomendaciones de los fabricantes de las tiras IPGs (Bio-Rad), se diseñó el programa mostrado en la Tabla 7 para tiras de 7cm, pH 3-10, rango lineal:

Paso	Descripción	Voltaje (V)	Tiempo (h)
1	Rehidratación pasiva	50	11
2	Rampa rápida	200	1
3	Rampa rápida	1000	1
4	Rampa rápida	2000	1
5	Rampa rápida	4000	Hasta acumular 10000 V/h
6	Rampa rápida	500	6

Tabla 7. Descripción del programa IEF para la separación de proteínas del plasma sanguíneo.

El paso de rehidratación pasiva permite que las proteínas solubilizadas se absorban al gel, por lo cual el voltaje empleado es bajo. Los pasos 1 al 4 se utilizan en escalera para no aplicar un voltaje muy fuerte de un solo instante y provocar degradación de proteínas. El paso crítico, en el cual se da la separación de proteínas es el 5; en este caso se varió entre 10000 y 16000 V/h, encontrándose que 10000 V/h es un voltaje suficiente que permite la separación de proteínas sin provocar sobre-enfoque ni daño de las tiras por el alto voltaje.

7.3.4. Evaluación métodos tinción para geles bidimensionales

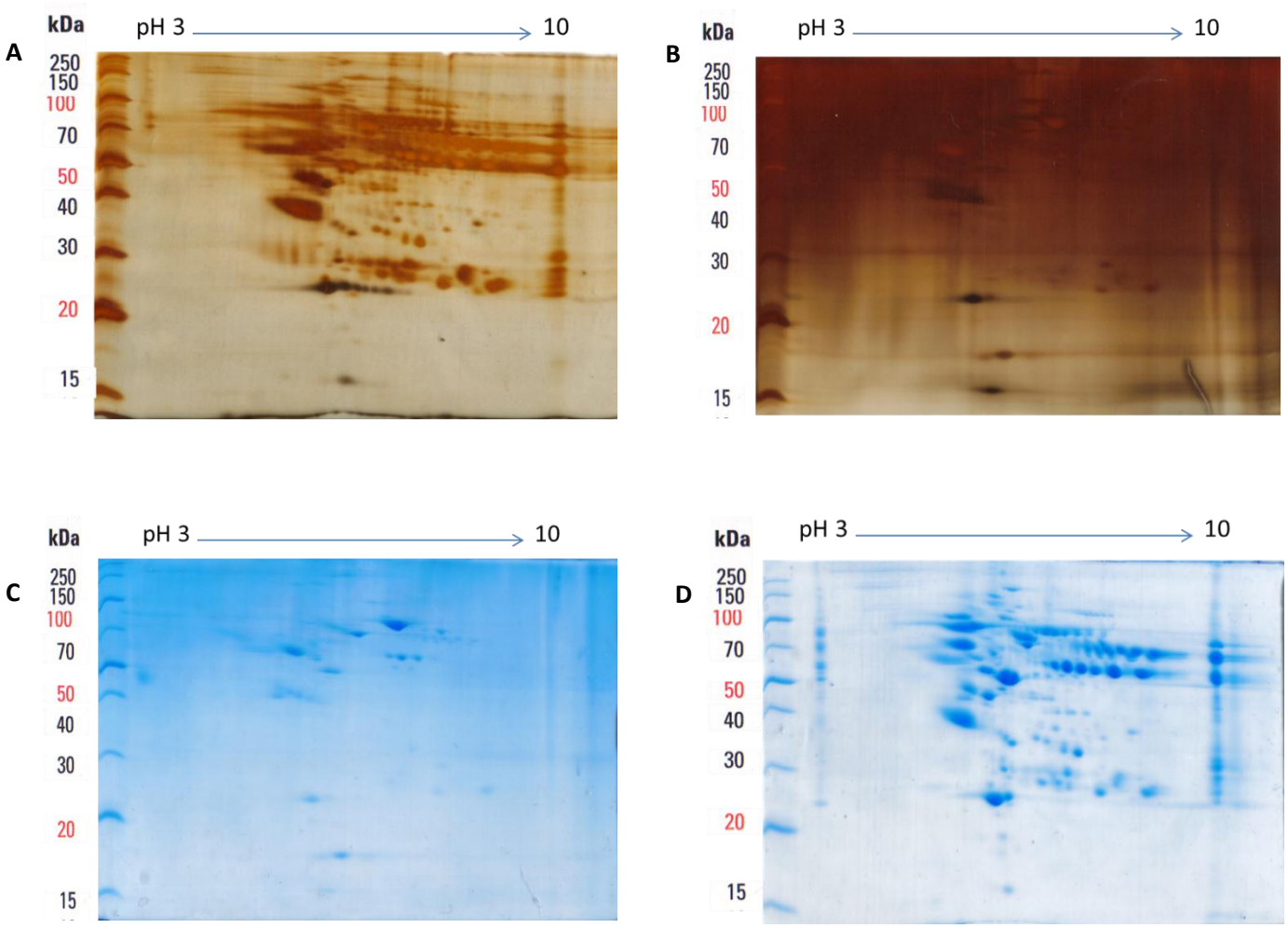


Figura 5. ***Efecto del método de visualización de spots de proteína en geles bidimensionales***. Tinción con plata: **A.** 20µg de proteína y **B.** 100µg de proteína. Tinción con azul de Coomassie coloidal G-250: **C.** 20µg de proteína y **D.** 100µg de proteína.

En este trabajo se ensayaron dos métodos de tinción para la detección de *spots* de proteína en los geles bidimensionales, tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 y tinción con plata compatible con espectrometría de masas (Thermo Scientific). Debido a que la sensibilidad de los métodos varia, se debe partir de una cantidad de proteína diferente al momento de realizar la separación proteica. Para la tinción con azul de Coomassie se partió de 100µg de proteína para obtener los geles bidimensionales, mientras que para la tinción con plata se partió de 20µg de proteína. Los resultados se muestran en la Figura 5, en la cual se observa un perfil electroforético similar cuando se parte de la cantidad de proteína recomendada para cada método (Figura 5A y 5D). Una mayor carga de proteína genera demasiadas señales inespecíficas (ruido de fondo) en la tinción con plata (Figura 5B) en lugar de aumentar la sensibilidad y por otra parte, menor cantidad de proteína para la tinción con azul de Coomassie genera una reducción importante en la sensibilidad (Figura 5C).

Se seleccionó la tinción con azul de Coomassie como método de visualización de los *spots* de proteína partiendo de 100 µg. Dos razones fundamentales para esta selección fueron: 1) Se observa un perfil muy similar a la tinción con plata que es teóricamente más sensible (1 ng de proteína, Smejkal GB, 2004) que la tinción con Coomassie (8 ng proteína, Görg A et al., 2004) y 2) Genera menor cantidad de ruido de fondo que la tinción con plata.

7.4. Evaluación métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por electroforesis bidimensional

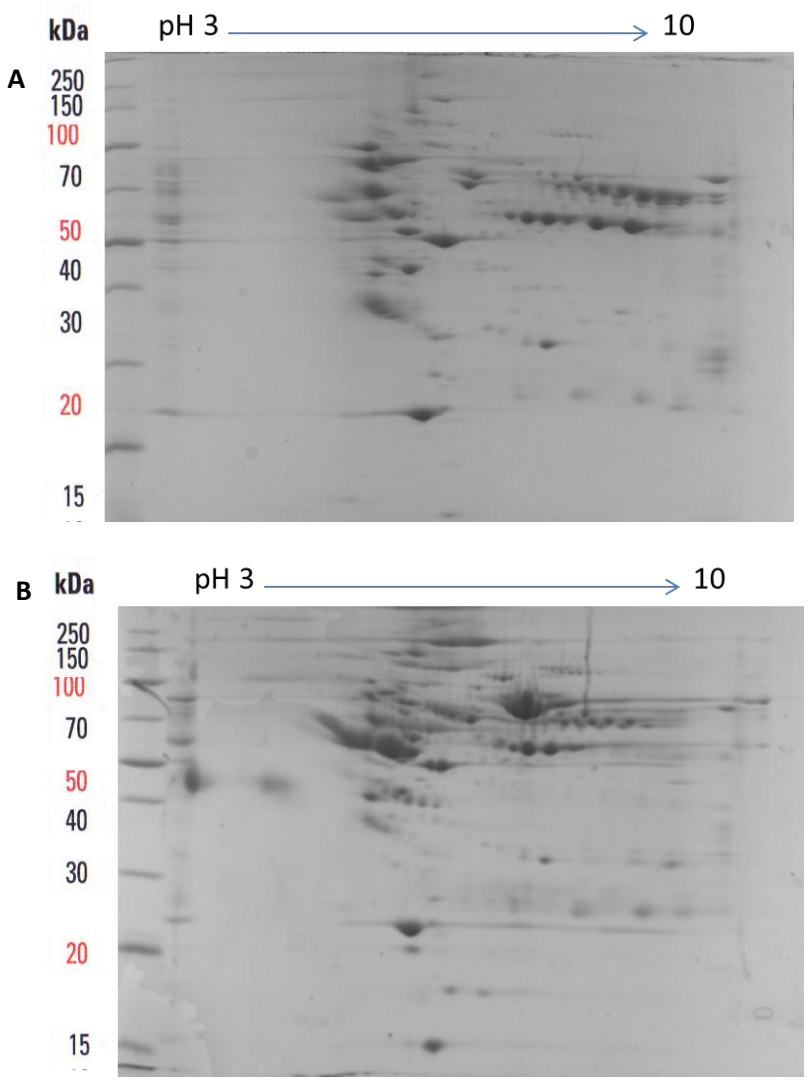


Figura 6. ***Evaluación métodos de reducción de la complejidad del plasma sanguíneo por 2DE.*** Geles bidimensionales de plasma de niño sano corridos con las condiciones optimizadas. **A.** plasma enriquecido con columna ProteoMiner™ y **B.** Plasma inmunodepletado columna ProteoPrep®.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para la obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo de niños, se evaluaron los perfiles bidimensionales de las dos principales fracciones de cada uno de los dos métodos de reducción de la complejidad de las proteínas del plasma.

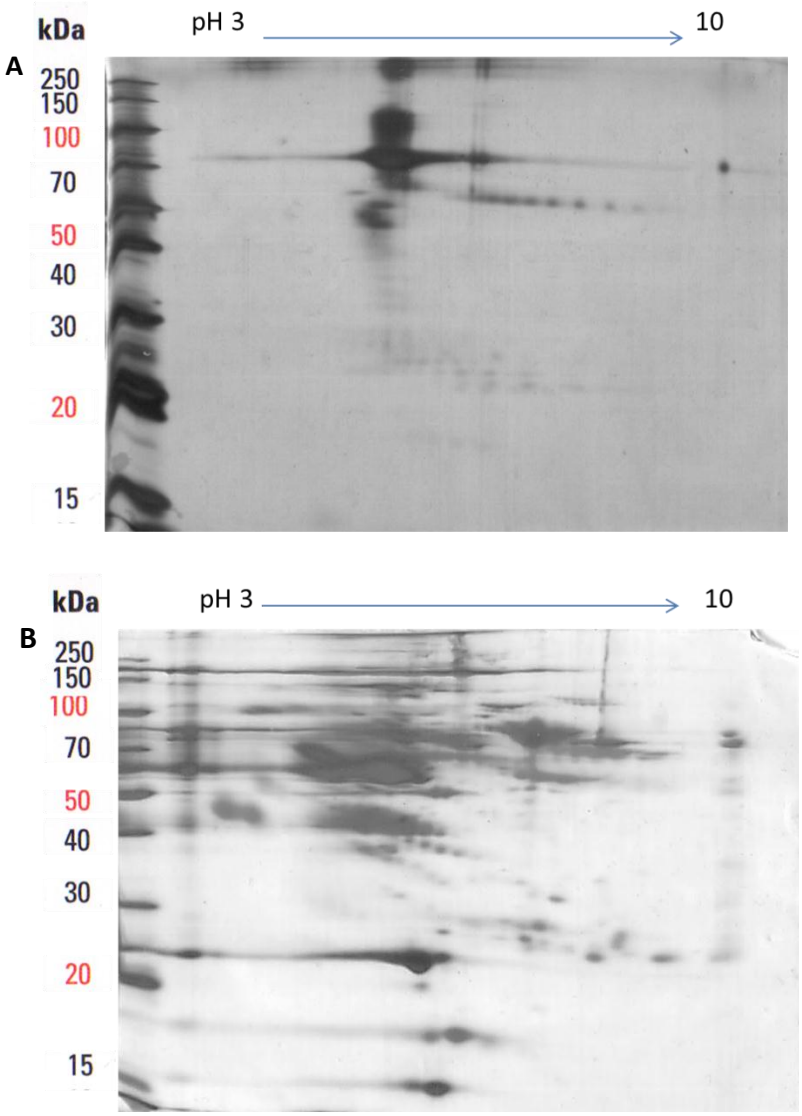


Figura 7. ***Evaluación proteínas de menor interés en los métodos de reducción de la complejidad del plasma.*** **A.** Proteínas retenidas de la columna ProteoPrep® y **B**. Proteínas no retenidas de la columna ProteoMiner^{TM}. Tinción con plata, 100µg de proteína.

Para lo anterior se utilizaron las condiciones optimizadas: 100µg de proteína, precipitación con TCA/acetona y solubilización con buffer Urea7M/Tiourea2M, el programa optimizado de enfoque isoeléctrico y la tinción con azul de Coomassie coloidal. En la Figura 6 se muestran ejemplo de los geles obtenidos, donde claramente se observa una reducción importante en la saturación de

spots de proteínas de alta abundancia con respecto al plasma sin tratamiento (Figura 1). Esto es visible en los geles bidimensionales de ambos acercamientos.

El análisis bidimensional de las fracciones proteicas descartadas en ambos métodos (Figura 7) permitió evaluar la eliminación no selectiva de proteínas a través de la columna ProteoPrep®, así mismo permite observar la eliminación inespecífica de proteínas a través de la columna ProteoMiner™.

7.5. Evaluación análisis de proteínas por espectrometría de masas

Con el propósito de evaluar la identificación de proteínas en los geles bidimensionales por espectrometría de masas, se picaron *spots* de proteína tanto en geles en formato de 7cm como de 18cm, ambos en el rango de pH 3-10.

Los *spots* de proteína se lavaron 3 veces con una solución de acetonitrilo 50% y bicarbonato de amonio 25mM. A continuación los *spots* de proteína se trataron con una solución de tripsina 20 ng/mL (Promega) durante 18 horas. Los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas en un equipo con configuración MALDI-TOF/TOF. La identificación de las proteínas se hizo por comparación con bases de datos mediante el motor de búsqueda MASCOT *(http://www.matrixscience.com)*. Los análisis de masas se realizaron en el Instituto Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, Brasil.

Los resultados en geles de 7cm se relacionan en la Figura 8 y Tabla 8. Los resultados de análisis de masas e identificación de proteínas por MASCOT para geles de 18cm se muestran en la Figura 9 y Tabla 9. Lo primero que se puede observar es la desaparición de los *spots* abundantes correspondientes a albúmina e IgG; los *spots* que se mantienen en mayor intensidad relativa corresponden a la serotransferrina, el fibrinógeno (cadenas α y β), antitripsina y haptoglobina, las cuales se sabe son proteínas de alta abundancia en el plasma sanguíneo. Analizando los valores de puntaje de confiabilidad (*score*) en la identificación, se observa mayores valores de *score* para los geles en formato grande, lo cual no quiere decir que la identificación en geles de menor formato no sea confiable, ya que para la mayoría de las identificaciones también tienen alto valor de *score* y varios péptidos asignados a dichas proteínas (#*Match*).

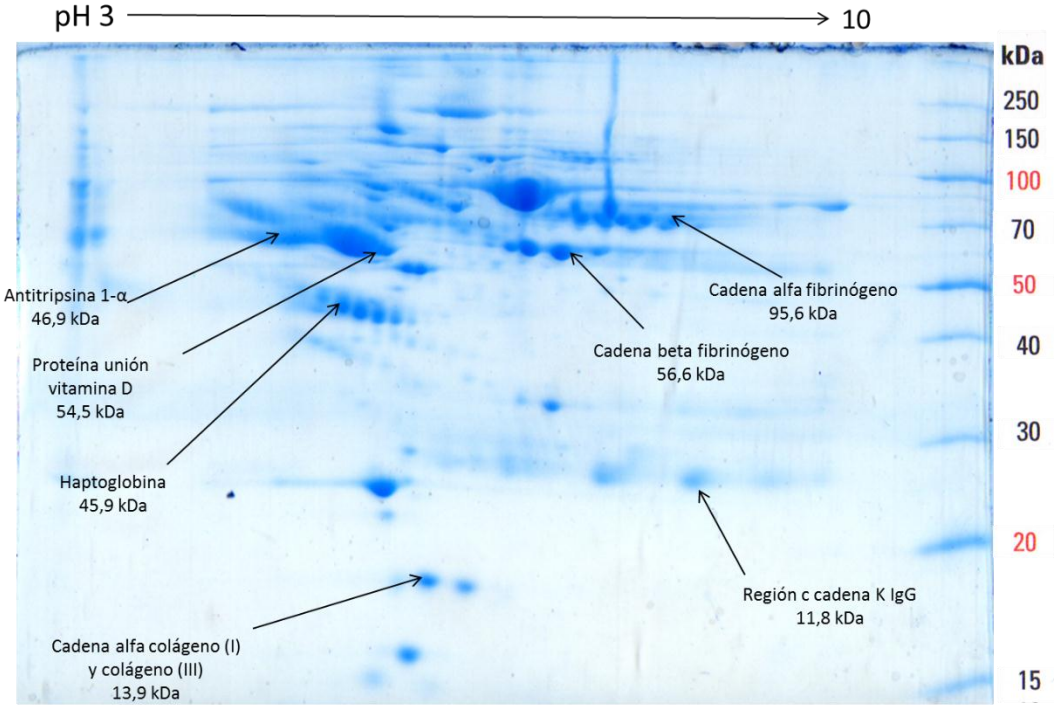


Figura 8. ***Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-MS/MS en geles en formato de 7cm.***

Codificación # spot	Score	*#Match*	Proteína identificada	Masa (kDa)
210	140	5	Cadena alfa del fibrinógeno	95,656
220	288	8	Cadena beta del fibrinógeno	56,577
711	62	1	Cadena alfa del colágeno	139,883
911	68	3	Cadena C de IgK	11,773
1011	205	5	Haptoglobina	45,861
1111	142	3	Antitripsina 1-alfa	46,878
1111	90	2	Alfa 2 –HS glicoproteína	40,098
1211	375	8	Proteína unión a vitamina D	54,526

Tabla 8. Lista de proteínas identificadas a partir de *spots* de proteína en geles de 7cm

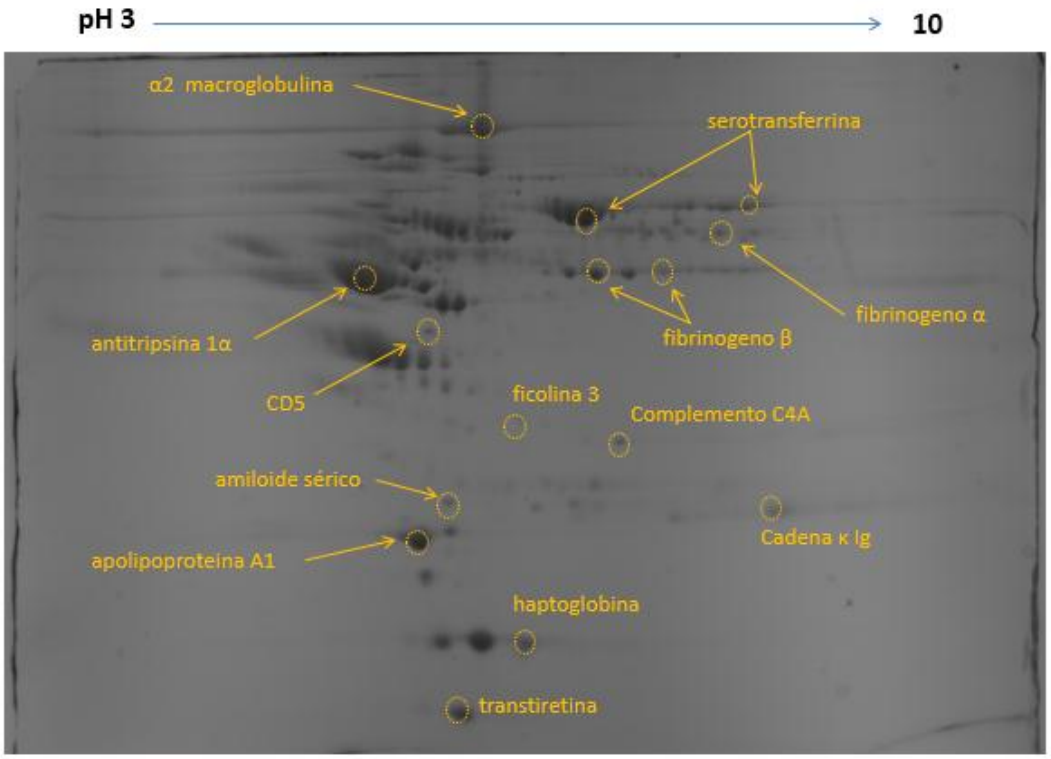


Figura 9. ***Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-MS/MS en geles formato de 18cm.***

# *spot*	score	*#match*	Proteína	Masa
1	300	7	Serotransferrina	79,294
2	413	6	Complemento C4-A	194,247
3	254	4	Transtiretina	15,991
4	107	1	Haptoglobina	45,861
5	236	3	Región C cadena kappa Ig	11,773
6	371	7	Ficolina 3	33,395
7	418	9	Serotransferrina	79,294
8	573	9	Antígeno tipo CD5	39,603
9	244	5	Componente amiloide P serico	25,485
10	445	7	Antitripsina 1-alfa	46,878
11	591	9	Cadena beta fibrigoneno	56,577
12	200	4	Cadena alfa fibrinogeno	95,656
13	427	10	Apolipoproteina A1	30,759
14	663	9	Cadena beta fibrinogeno	56,577
15	423	9	Alfa 2 macroglobulina	164,613

Tabla 9. Lista de proteínas identificadas a partir de *spots* de proteína en geles de 18cm

Por lo anterior se estableció obtener los perfiles proteicos bidimensionales en formato de 7cm, en estos fue posible la identificación de proteínas con alta confidencia.

7.6. Obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B

Se obtuvieron geles bidimensionales de plasma sanguíneo para un grupo de niños sanos (n=6) y una muestra de plasma sanguíneo de un niño diagnosticado con LLA tipo B. Para la muestra de LLA-B se obtuvieron geles bidimensionales de plasma sanguíneo recién diagnosticado y después del tratamiento de inducción (4 semanas después). Las muestras se procesaron de acuerdo con las condiciones anteriormente optimizadas:

- Inmunodepleción de albúmina e IgG mediante columnas ProteoPrep®
- Precipitación con TCA/acetona
- Disolución con buffer urea/tiourea
- Tinción con azul de Coomassie coloidal G-250

Las muestras se corrieron por triplicado. Para el enfoque isoeléctrico se emplearon tiras IPGs de 7cm pH 3-10 rango lineal (Bio-Rad). La electroforesis SDS-PAGE, se hizo en geles al 12%. Finalizado el proceso de tinción los geles se documentaron mediante el equipo VersaDoc (Bio-Rad) a través del programa Quantity One (Bio-Rad) para posterior análisis de imágenes. En la Figura 10 se muestra el perfil proteico bidimensional para el plasma sanguíneo de un niño sano y el plasma sanguíneo de un niño diagnosticado con LLA-B antes y después del tratamiento de inducción.

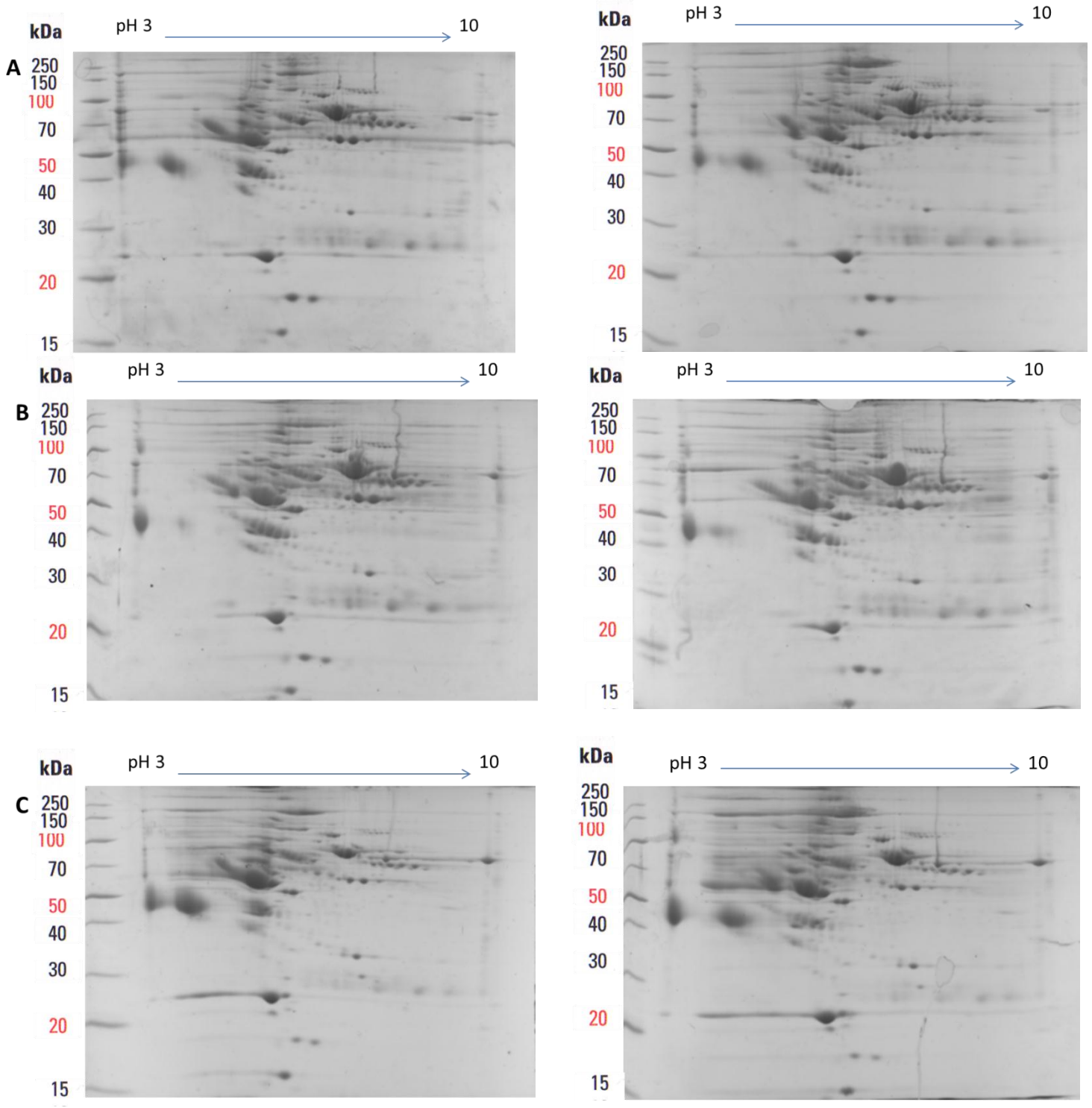


Figura 10. ***Geles bidimensionales de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B.*** **A)** Plasma de un niño sano **B)** plasma de un niño diagnosticado con LLA-B antes del tratamiento de inducción y **C)** plasma del niño diagnosticado con LLA-B después del tratamiento de inducción.

En la Figura 10 se observa que para cada muestra se obtuvo una buena resolución o separación de las proteínas del plasma, además se observa alta reproducibilidad entre los duplicados de cada muestra.

7.7. Análisis de imágenes comparativo entre el plasma de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B

El programa de análisis de imágenes de geles bidimensionales Melanie 7.0 permitió la comparación entre los geles de los diferentes grupos estudiados: plasma sanguíneo de niños sanos y plasma sanguíneo de niños diagnosticados con LLA-B. Para el análisis de imágenes se siguió el orden consecutivo:

1. Selección y edición de imágenes
2. Establecimiento del orden jerárquico del análisis
3. Identificación de *spots* de proteína en los geles
4. Emparejamiento o *match* de los diferentes *spots* en los geles
5. Análisis de clases o grupos

Para el análisis de plasma sanguíneo se tuvieron 3 grupos: niños sanos, niños diagnosticados con LLA-B antes del tratamiento de inducción y niños diagnosticados con LLA después del tratamiento de inducción. El orden jerárquico establecido para el análisis de imágenes se muestra en la Figura 11.

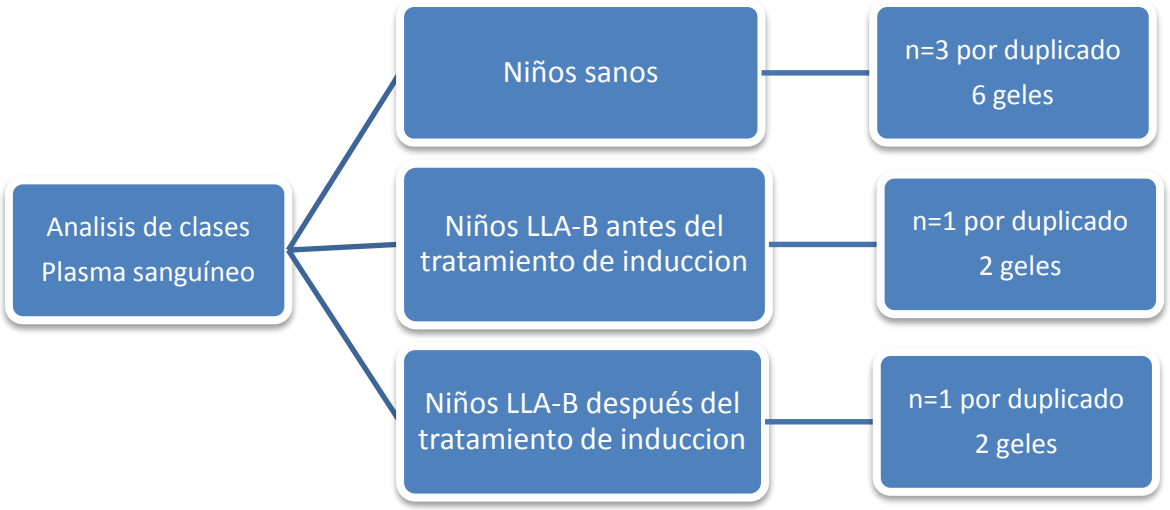


Figura 11. ***Orden jerárquico establecido para el análisis de imágenes de plasma sanguíneo.*** Para cada muestra se tuvieron duplicados y cada grupo tenía por lo menos una réplica biológica.

Una vez realizados los pasos mencionados anteriormente, el programa permitió realizar dos tipos de análisis: 1) análisis de geles y 2) análisis de clases. En el análisis de geles, se estableció el número de *spots* de proteína detectado en cada gel y el porcentaje de coincidencia entre los geles en comparación con un gel que se toma como imagen de referencia. En el segundo se puede determinar las diferencias en cuanto a *spots* de proteína entre los diferentes grupos biológicos estudiados.

7.7.1. Análisis de geles de plasma sanguíneo

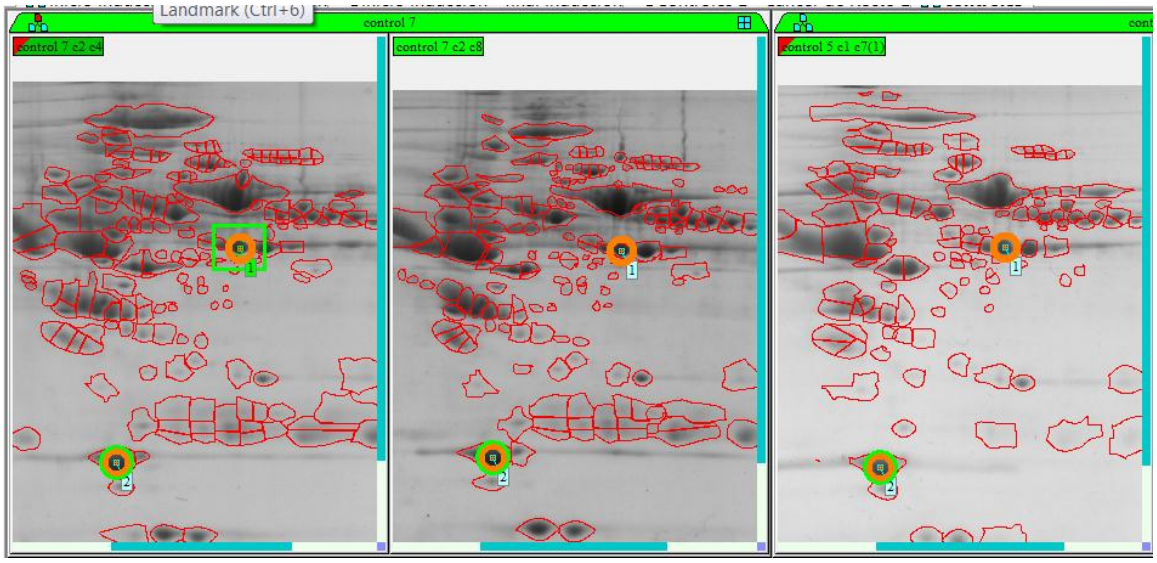
Para realizar el análisis de geles, primero fue necesario realizar la detección de *spots* en todos los geles en cada grupo, para esto se seleccionaron los parámetros descritos en la Tabla 10.

Parámetro	Valor	Significado
Smoth	10	Número de veces que el programa suaviza la imagen antes de la detección de los *spots*
Silency	100	Profundidad del *spot*: que tanto un *spot* sobresale con respecto a sus alrededores
Mean Peak	5	Elimina los *spots* que tienen una área más pequeña que el umbral especificado (expresado en número de pixeles)

Tabla 10. Parámetros seleccionados para la identificación de *spots* en los geles bidimensionales de plasma sanguíneo.

Una vez realizada la detección de *spots* en todos los geles, se realizó el *match* entre todos los geles independientemente al grupo al cual estos pertenecen. Para este paso, se utilizó un *spot* como referencia o *landmark* o varios de estos, de manera que los *spots* en los diferentes geles encontraran sus correspondientes en los demás geles. Se seleccionó el mismo *landmark* para todos los geles (Figura 12A).

A



B

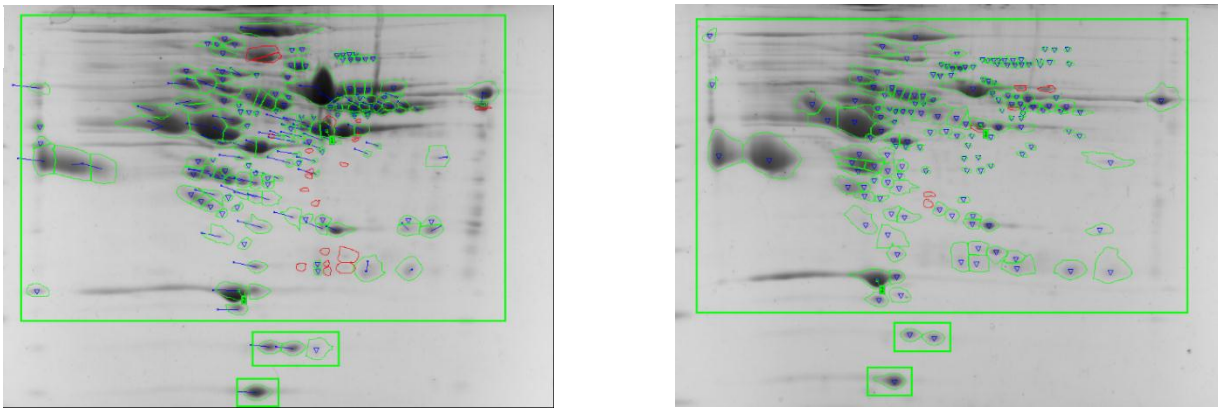


Figura 12. ***Detección y match en los geles bidimensionales en el programa Melanie 7.0*** A) detección de *spots* y selección de landmarks (círculos naranja). B. *Match* entre un gel de un plasma control y un gel de un plasma de LLA.

Después de realizar el *match* entre los geles, se realizó la etapa de edición, en la cual se eliminan o corrigen los falsos o incorrectos *match* y/o *spots*. Los resultados de la etapa de análisis de geles se resumen en la Tabla 11, en donde se encuentra el número de *match* de cada gel contra el gel que fue tomado de referencia para el análisis (Niño sano 7).

Nombre Gel	Numero *Match*	% *Match*
Niño sano 7 gel 1 (Referencia)	196	99
Niño sano 7 gel 2	186	94
Niño sano 5 gel 1	162	98
Niño sano 5 gel 2	166	91
Niño sano 10 gel 1	177	98
Niño sano 10 gel 2	168	99
LLA 3 inicio inducción gel 1	184	97
LLA 3 inicio inducción gel 2	172	99
LLA 3 fin inducción gel 1	170	98
LLA 3 fin inducción gel 2	159	96

Tabla 11. Conteo de *match* entre los diferentes geles bidimensionales para plasma sanguíneo.

Después de realizado el *match* entre los geles, se procedió a realizar el análisis de factores, el cual permite evidenciar si existen diferencias significativas en los perfiles de expresión globales entre las muestras. El análisis factorial examina la relación entre un gran número de variables (valores de *spots* para una serie de geles) y explica estas relaciones (poblaciones de geles) en términos de unos factores comunes.

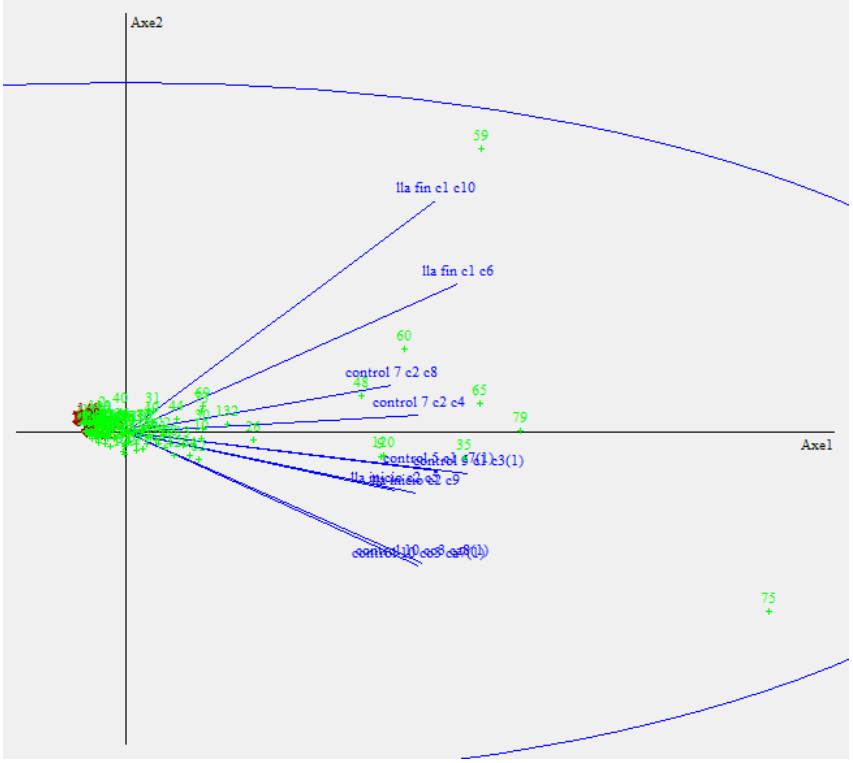


Figura 13. ***Análisis factorial para los geles de muestras de plasma sanguíneo.***
En color verde se muestra los *spots* que han hecho *match* y en rojo aquellos que no.

Este análisis se muestra en la Figura 13, en esta se observa que la mayoría de los *match* se encuentran concentrados en el origen y por lo tanto no son significantes para clasificar los geles, mientras que los que se encuentran alejados del origen son aquellos más significativos en cuanto a clasificación de los geles. Además permite ver la similaridad que existe entre geles; los geles que se encuentran adyacentes en la gráfica de factor son similares entre ellos y se podrían clasificar dentro de una población. En este caso, los geles de la muestra de LLA después del tratamiento de inducción se encuentra claramente separados de los demás geles (controles y muestra LLA recién diagnosticada), sugiriendo que estos geles tienen *spots* característicos que permiten diferenciarlos de los demás grupos.

7.7.2. Análisis de clases para geles de plasma sanguíneo

El análisis de clases permite identificar variaciones en la expresión de proteínas entre las poblaciones de geles. La tabla Análisis de clases muestra el *match* entre los grupos. De esta tabla se hizo un filtro para seleccionar los *spots* diferenciales significativos, el parámetro para analizar las diferencias de *spots* fue el *match count*, el cual indica el número de grupos o clases en las cuales el *spot* está presente y hace *match*. Para los *spots* que se encuentran en todos los grupos, se seleccionaron aquellos que muestran un cambio en la abundancia mayor a 3 (*Fold*>3). Bajo estos dos criterios se encontraron 21 *spots*, los cuales se resumen en la Figura 14, Tabla 12. En la figura

15 se muestran *spots* significativos únicos para el grupo de niños sanos y únicos para el grupo de niños diagnosticados con LLA-B.

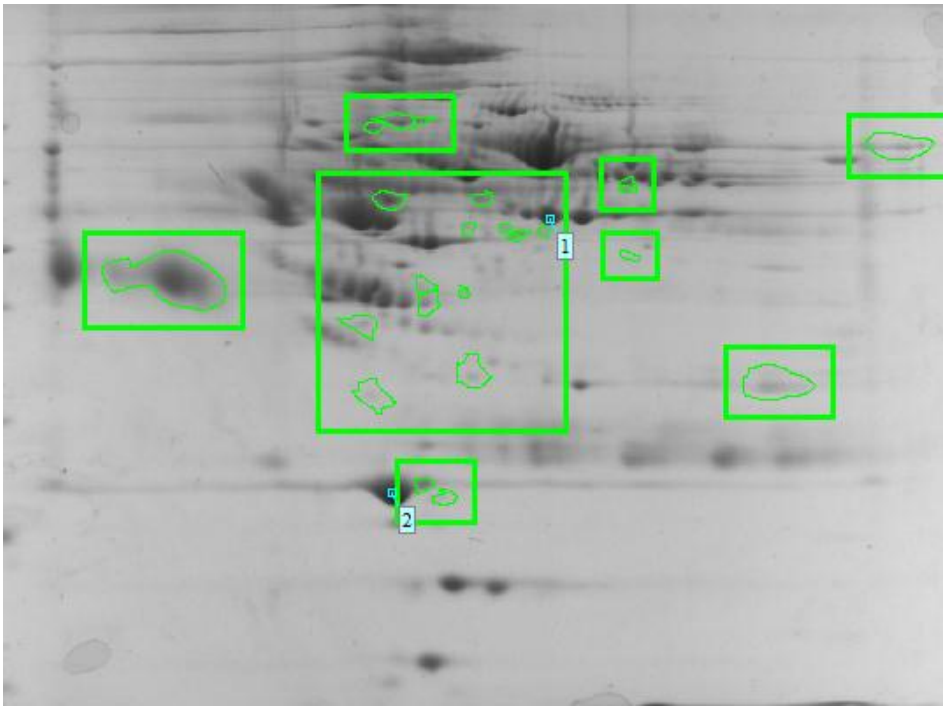


Figura 14. ***Spots con expresión diferencial en los plasmas sanguíneos.*** Mapa de *spots* en los 3 grupos con expresión diferencial (*Fold* >3).

***Match* ID**	**Max**	***Fold***	***Match* Count**	**Anova**
1	0,224279	3,9477	3	0,169133
2	0,28322	7,15315	3	0,112956
6	0,150507	7,8547	3	3,85E-05
9	3,99645	1,67072	3	0,791423
11	0,181058	3,20864	3	0,589275
14	0,155996	7,00061	3	1,84E-04
16	0,0474442	3,54885	3	0,54177
28	0,542968	3,41166	3	0,225621
31	1,41651	6,18542	3	0,0966193
33	0,0533327	3,16433	3	0,0708086
34	0,0870143	6,26384	3	0,00105898
40	0,757401	4,67219	3	0,0112984
41	0,651551	4,80906	3	0,0202831
52	0,347072	3,60357	3	0,133231

56	0,423224	3,75807	3	0,0029064
59	9,38754	9,58763	3	0,0133423
67	0,268955	3,23611	3	0,0615346
118	0,244542	3,36808	3	0,150163
121	0,0611694	3,7866	3	0,0443445
128	0,0577708	3,3302	3	0,260562
129	0,325383	4,57793	3	5,69E-04

Tabla 12. Resumen de *match* con expresión en los 3 grupos (controles, antes y después de la inducción) con un *fold* mayor a 3.

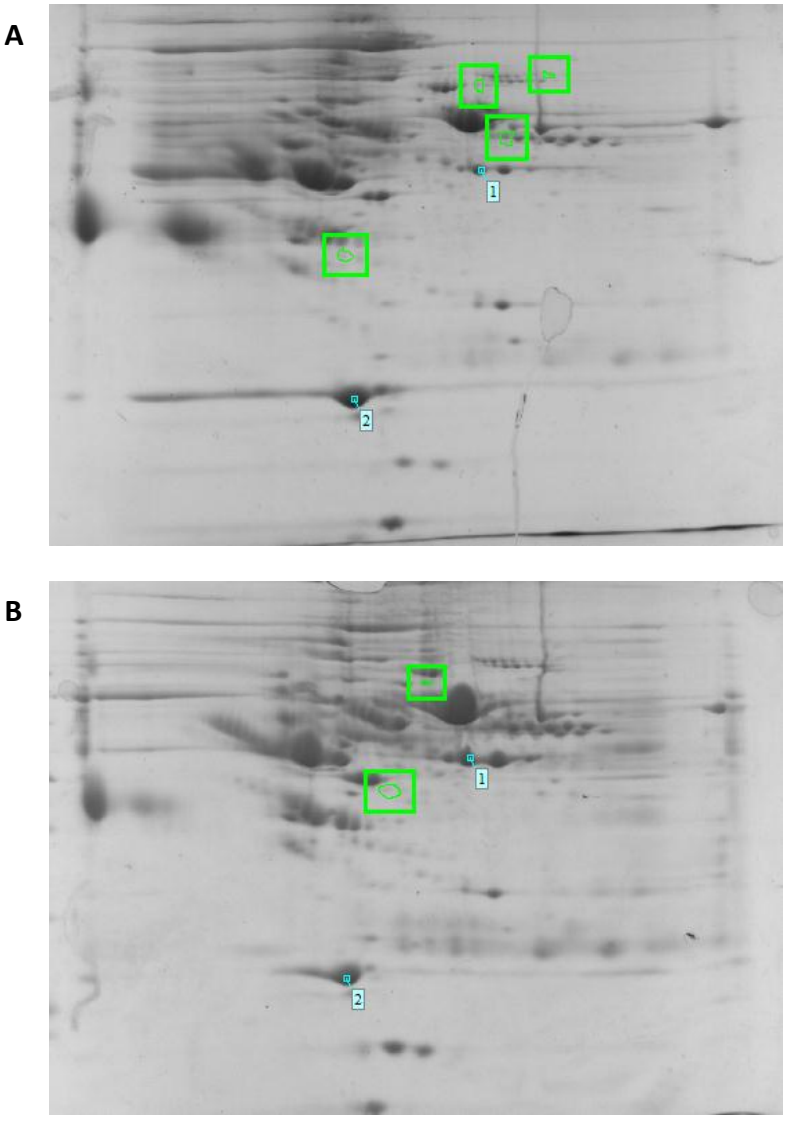


Figura 15. ***Spots únicos representativos de cada grupo en el análisis del plasma sanguíneo.*** **A.** *spots* únicos en el grupo de niños sanos **B.** *spots* únicos en el grupo de niños diagnosticados con LLA-B

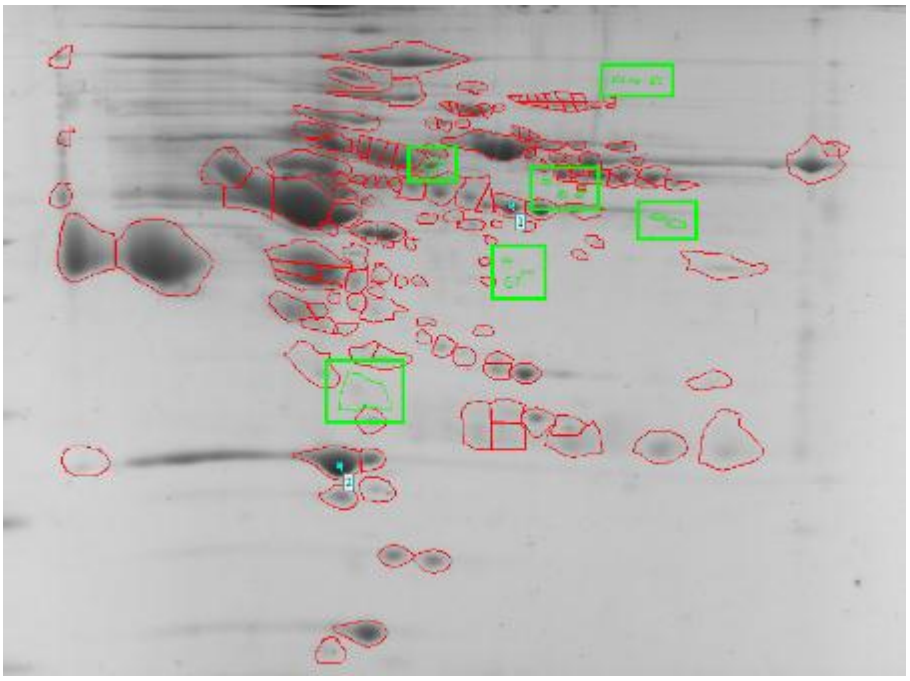


Figura 16. ***Spots de proteína únicos en plasma sanguíneo de la muestra de LLA-B después del tratamiento de inducción.***

7.8. Análisis de proteínas por espectrometría de masas de *spots* con expresión diferenciales en plasma sanguíneo

Algunos *spots* de proteína que mostraron expresión diferencial entre los grupos de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem por la metodología MALDI-TOF/TOF y análisis bioinformático para la identificación de proteínas mediante bases de datos a través del motor de búsqueda MASCOT. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 17 y Tabla 14 (ver Anexo 4).

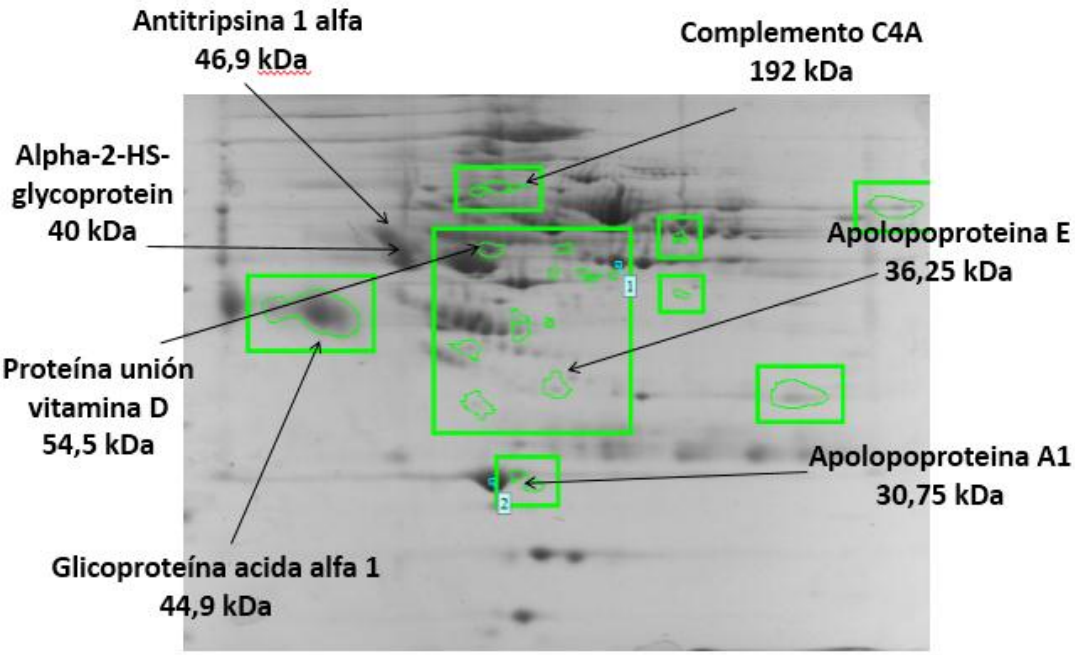


Figura 17. ***Identificación de proteínas diferenciales entre niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B.*** Los *spots* de proteína se digirieron con tripsina, se analizaron por MALDI-TOF/TOF y se identificaron mediante el motor de búsqueda MASCOT modo de búsqueda MS/MS con los parámetros de búsqueda que se resumen en la Tabla 13 *(http://www.matrixscience.com/)*.

Parámetro	Descripción
Base de datos	SwissProt
Enzima	Tripsina
Taxonomia	Homo Sapiens (Human)
Error de corte permitido	1
Cuantificación	Ninguno
Modificaciones fijas	Carbamidometil (C)
Tolerancia Peptido +/-	1,2 Da
MS/MS tol +/-	0,6 Da
Carga péptido	1+
Modo de reportar masa	Monoisotopico
Instrumento	MALDI-TOF-TOF

Tabla 13. Parámetros de identificación de proteínas mediante el motor de búsqueda MASCOT modo MS/MS.

# spot	Score	*#Match*	Proteína	Masa
1311	37	1	Proteína unión a vitamina D	54,53
1511	105	4	Apolipoproteina E	36,25
501	275	19	Complemento C4A	194,3
504	242	2	Alfa-2-HS-glicoproteina	40,09
13	427	10	Apolipoproteina A1	30,76
220	288	8	Cadena beta del fibrinógeno	56,58
***1**	---	---	Glicoproteína acida alfa 1	44,92

***1 por comparación con gel referencia de plasma sanguíneo (Expasy Swiss2D PAGEP Database *http://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/*)**

Tabla 14. Resumen de proteínas con expresión diferencial entre controles y las muestras de LLA-B.

7.9. Obtención de geles bidimensionales de plasma de médula ósea

La médula ósea es el sitio primario en el cual se genera la leucemia y cuya muestra se utiliza para su diagnóstico. Ya que se pudo contar con una muestra de este tipo se analizó el perfil proteico del plasma de médula ósea con el propósito de validar los resultados encontrados en plasma sanguíneo, esto es; si las proteínas encontradas como diferenciales en plasma sanguíneo también se encuentran en plasma y están relacionadas directamente con procesos de la enfermedad. Para este propósito se cuenta con dos muestras de médula ósea pertenecientes a un mismo paciente de LLA-B, la cual se recolecto para su diagnóstico y finalizada la fase del tratamiento de inducción.

De manera similar como ocurrió con el plasma sanguíneo, se hizo necesario caracterizar el plasma de médula ósea en cuanto a concentración de proteínas y perfil electroforético para evaluar la necesidad o no de reducir su complejidad.

7.9.1. Cuantificación de Proteínas en plasma de médula ósea

El contenido de proteínas en las muestras de plasma de médula ósea se cuantificó mediante BCA. La curva patrón se realizó con BSA entre 0,0625 y 2 mg/mL. Estos resultados se muestran en la Tabla 15.

Muestra	*Concentración (µg/µL)*
Plasma de médula ósea muestra LLA 3 antes del tratamiento inducción	69,80
Plasma de médula ósea muestra LLA 3 después del tratamiento inducción	61,84

Tabla 15. Contenido de proteínas en los plasmas de médula ósea.

7.9.2. Obtención perfiles proteicos de plasma de médula ósea

El perfil proteico de los plasmas de médula ósea se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE. Estos perfiles se muestran en la Figura 18, en la cual se puede observar un perfil proteico muy similar al del plasma sanguíneo (Figura 1), en donde se observan algunas bandas de proteína intensas, que saturan los carriles, alrededor de 70 kDa la cual se adjudica a albúmina humana por comparación con un patrón de albúmina. Adicionalmente se obtuvo el perfil electroforético bidimensional de una muestra de plasma de médula ósea de la leucemia tipo B (LLA 3), esta se muestra en la Figura 19. Se debe aclarar que únicamente la muestra LLA 3 corresponde a un diagnóstico de LLA-B, Las demás muestras de médula corresponden a muestras de pacientes con diagnostico diferente a LLA-B, por lo que solamente se corrió su perfil SDS-PAGE y no se tuvieron en cuenta para los análisis siguientes.

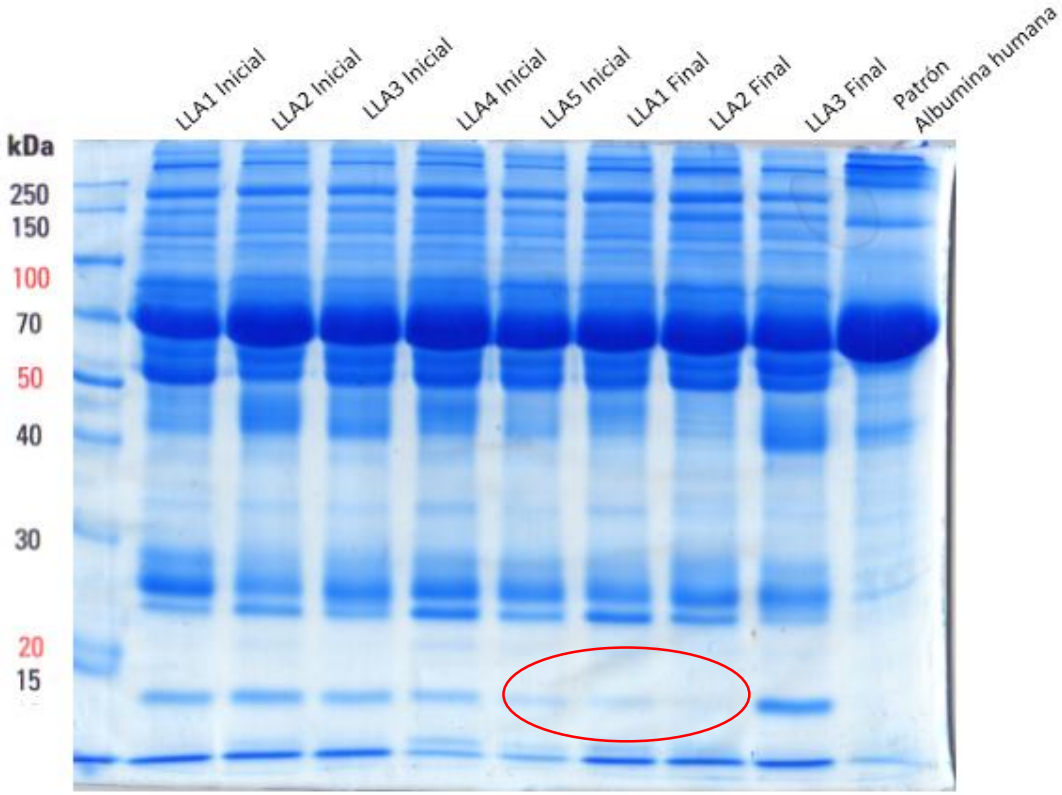


Figura 18. ***Perfil electroforético de plasma de médula ósea***. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de plasmas de médula ósea, 25µg de proteína por carril.

El perfil bidimensional de la muestra de plasma de médula ósea se parece mucho al del plasma sanguíneo, en donde se observan varios *spots* de proteína intensos en alrededor de 50-70kDa principalmente pertenecientes a proteínas de alta abundancia como albúmina e IgG.
De acuerdo a este perfil electroforético la caracterización del proteoma del plasma de médula ósea también necesito retirar proteínas de alta abundancia como albúmina e IgG a través del acercamiento validado para el plasma sanguíneo: Columnas de afinidad ProteoPrep® para remoción selectiva de estas dos proteínas. Todas las muestras de plasma de médula muestran un patrón similar independiente del tipo de leucemia, sin embargo, se observa algunas bandas menos

intensas a bajo peso molecular (menores a 30kDa) para algunas muestras como para LLA 1final, LLA 2final y LLA 5final (ver delineamiento rojo en la Figura 18).

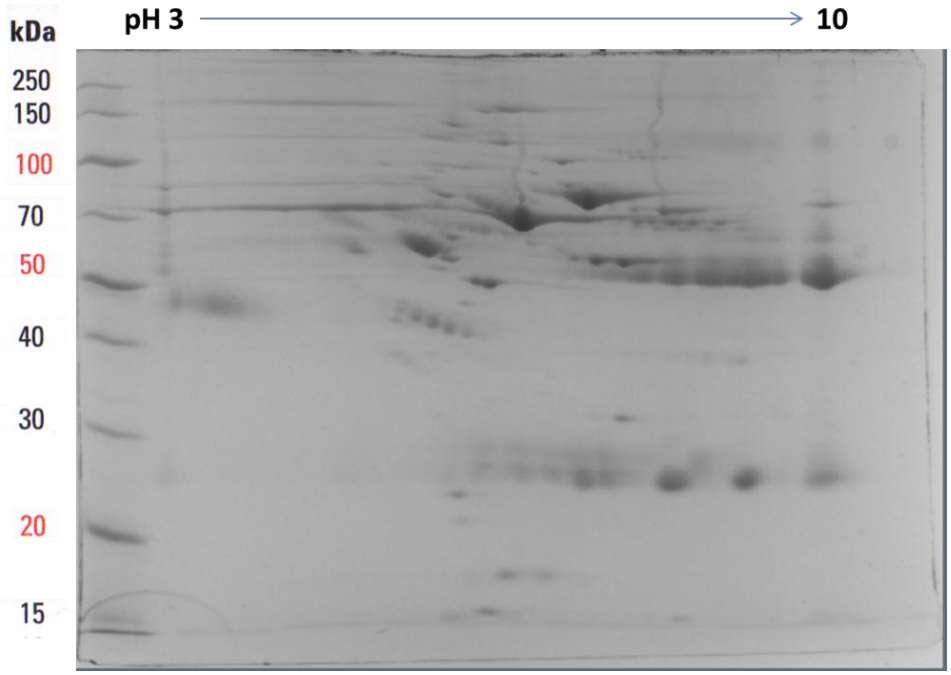


Figura 19. ***Perfil electroforético bidimensional de plasma de médula ósea.*** 100µg de proteína. Tinción con azul de Coomassie coloidal.

7.9.3. Cuantificación de proteínas en plasma de médula ósea depletados

Después de la depleción del plasma de médula ósea mediante ProteoPrep®. Se cuantifico la concentración de proteínas en las muestras depletadas y en los lavados de la . Estas se muestran en la Tabla 16

Muestra	Fracción proteica	Concentración final (µg/µL)
Plasma de médula ósea muestra LLA 3 antes del tratamiento inducción	Fracción eluida	4,64
	Primer lavado	0,574
	Segundo lavado	0,0869
Plasma de médula ósea muestra LLA 3 después del tratamiento inducción	Fracción eluida	4,83
	Primer lavado	0,462
	Segundo lavado	0,0128

Tabla 16. Contenido total de proteínas en las diferentes fracciones durante la inmunodepleción de un plasma de médula ósea con diagnóstico de LLA-B.

7.9.4. Electroforesis bidimensional de plasma de médula ósea depletado

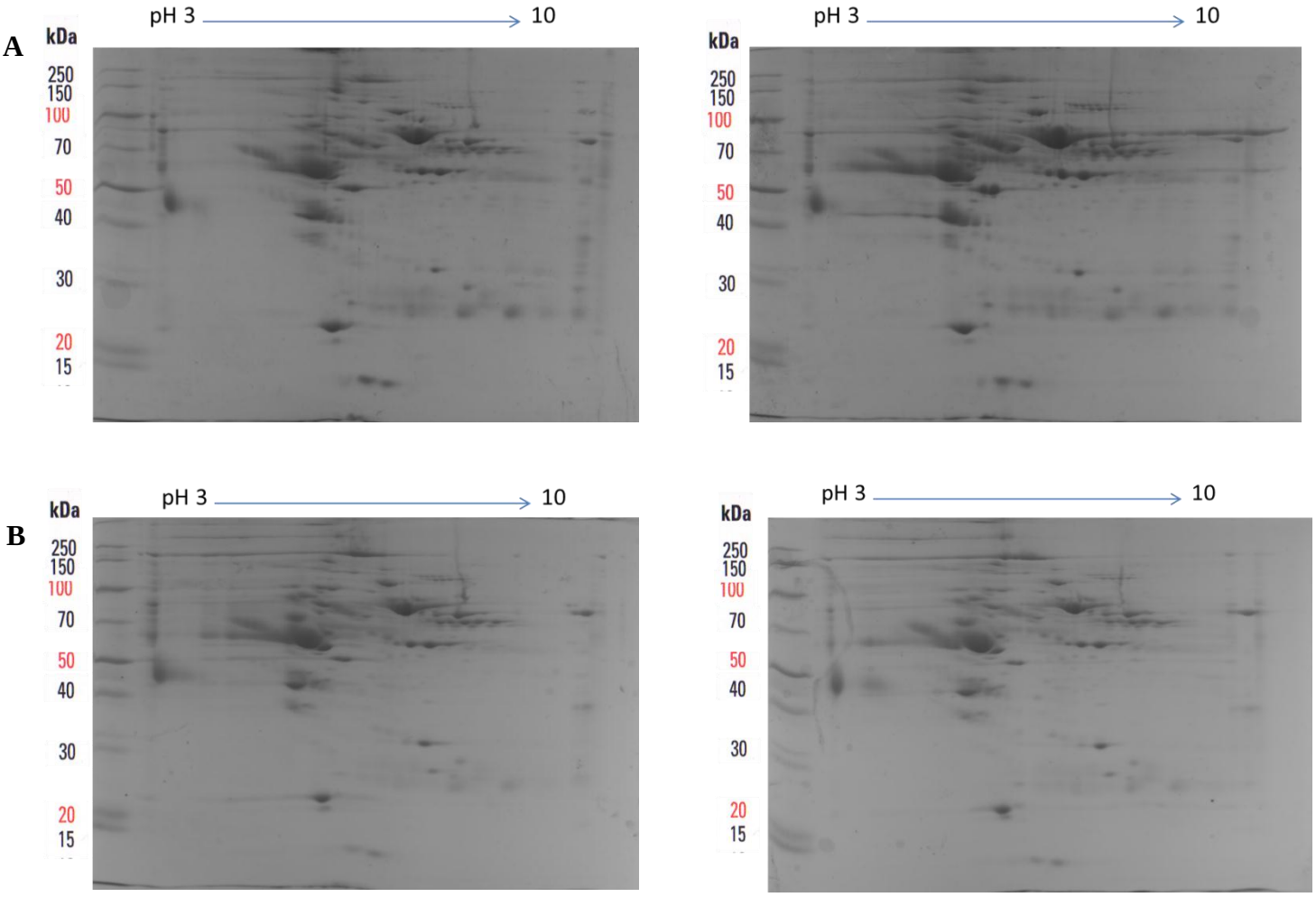


Figura 20. ***Perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma de médula ósea depletados.*** **A.** muestra de plasma paciente recién diagnosticado y **B.** muestra de plasma paciente después del tratamiento de inducción.

Las muestras de plasma de médula ósea inmunodepletadas a través de la columna ProteoPrep® para la remoción de albúmina e IgG se separaron mediante 2DE utilizando las mismas condiciones ya optimizadas para el plasma sanguíneo: 1) precipitación de proteínas con TCA/acetona, 2) disolución en buffer urea 7M/tiourea 2M y 3) tinción con azul de Coomassie coloidal G-250. Las muestras se corrieron por triplicado y los geles se documentaron en el equipo VersaDoc para posterior análisis de imágenes. Estos resultados se muestran en la Figura 20. Al igual que para el plasma sanguíneo se evidencio un incremento importante en el número de *spots* y en la resolución de los geles después del tratamiento con las columnas ProteoPrep®. Estas imágenes se analizaron mediante el programa Melanie 7.0 para identificar diferencias en los perfiles de expresión antes y después del tratamiento de inducción.

7.9.5. Análisis de imágenes de plasma de médula ósea

Se siguió el mismo orden lógico descrito para el análisis de imágenes de plasma sanguíneo y de manera similar se realizó el análisis de geles y posterior análisis de clases.

7.9.5.1. Análisis de geles de plasma médula ósea

La Tabla 17 resume los resultados del análisis de geles después de los pasos de identificación de *spots* y *match*. En este caso se tomó como referencia el gel LLA 3 inicio inducción gel 3.

Nombre Gel	*Match* Count	%*Match*
LLA 3 inicio inducción gel 3	132	98
LLA 3 inicio inducción gel 2	124	89
LLA 3 inicio inducción gel 1	127	93
LLA 3 fin inducción gel 4	96	95
LLA 3 fin inducción gel 5	93	90
LLA 3 fin inducción gel 6	93	98

Tabla 17. Conteo de *match* entre los diferentes geles bidimensionales para plasma de médula ósea.

La grafica de factor de análisis para el plasma de médula ósea antes y después del tratamiento de inducción (Figura 21), muestra claramente que a diferencia de los geles de plasma sanguíneo, en este caso los geles se diferencian claramente entre ambos grupos, lo cual se traduce que existen *spots* de proteína únicos que permiten su diferenciación.

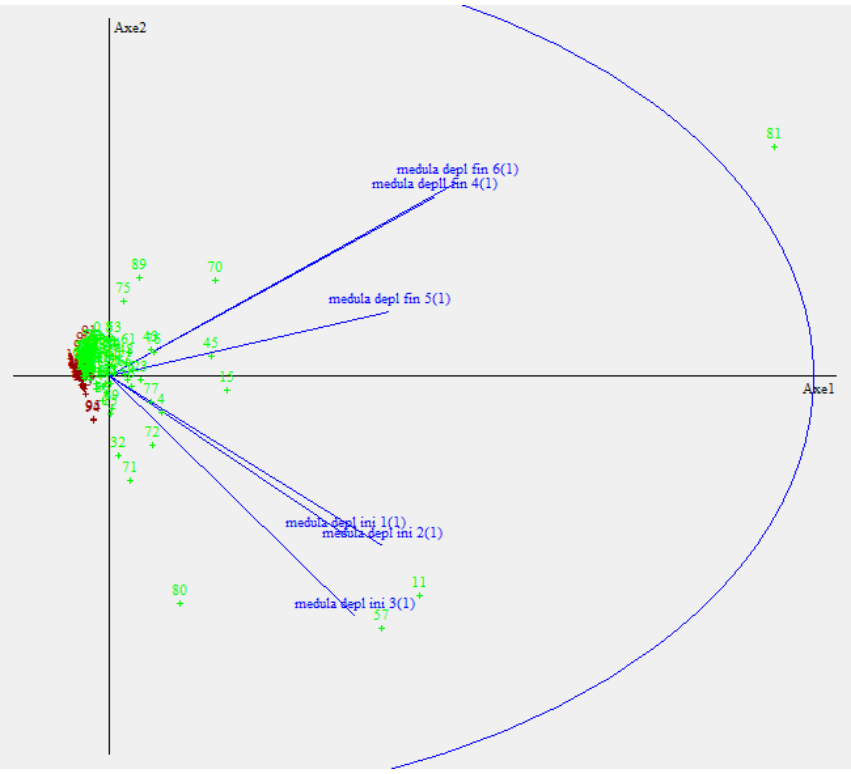


Figura 21. ***Análisis de factores para los geles de muestras de plasma de médula ósea.*** En color verde se muestra los *spots* que han hecho *match* y en rojo aquellos que no.

7.9.5.2. Análisis de clases de plasma médula ósea

El análisis comparativo de la muestra de LLA-B antes y después del tratamiento de inducción, mostro *spots* de proteína diferencialmente expresados entre ambos grupos, los *spots* mostrados en la Figura 22 y Tabla 18. Adicionalmente se muestran los *spots* de proteína únicos expresados en el grupo de plasma de médula antes del tratamiento de inducción (Figura 23) con una significancia estadística dada por ANOVA $p \leq 0{,}05$.

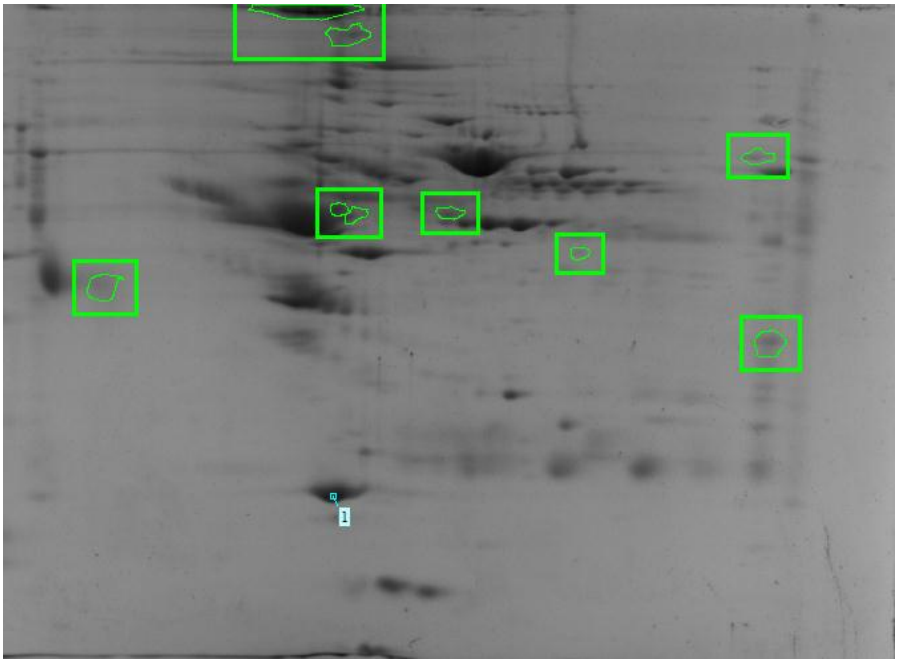


Figura 22. ***Spots con expresión diferencial en los plasmas de médula ósea.*** Mapa de *spots* en los 2 grupos con expresión diferencial (*fold* >3)

***Match* ID**	**Max**	***Fold***	***Match* Count**	**Anova**
0	1,18275	5,42835	2	0,0503661
16	6,23558	3,16758	2	0,0210891
27	1,12246	4,55172	2	0,0708434
28	3,01058	3,03284	2	0,00460654
29	4,39449	3,00574	2	0,00629262
32	1,96841	4,87899	2	0,0293693
54	2,03957	4,75858	2	0,0129545
71	9,34873	3,93381	2	0,0371805
75	5,27017	4,27958	2	0,0589682
80	6,99062	4,73539	2	8,83E-04
89	14,1329	5,93131	2	5,19E-04

Tabla 18. Resumen de *match* en plasma de médula ósea con expresión en los 2 grupos (antes y después de la inducción) con un *fold* mayor a 3.

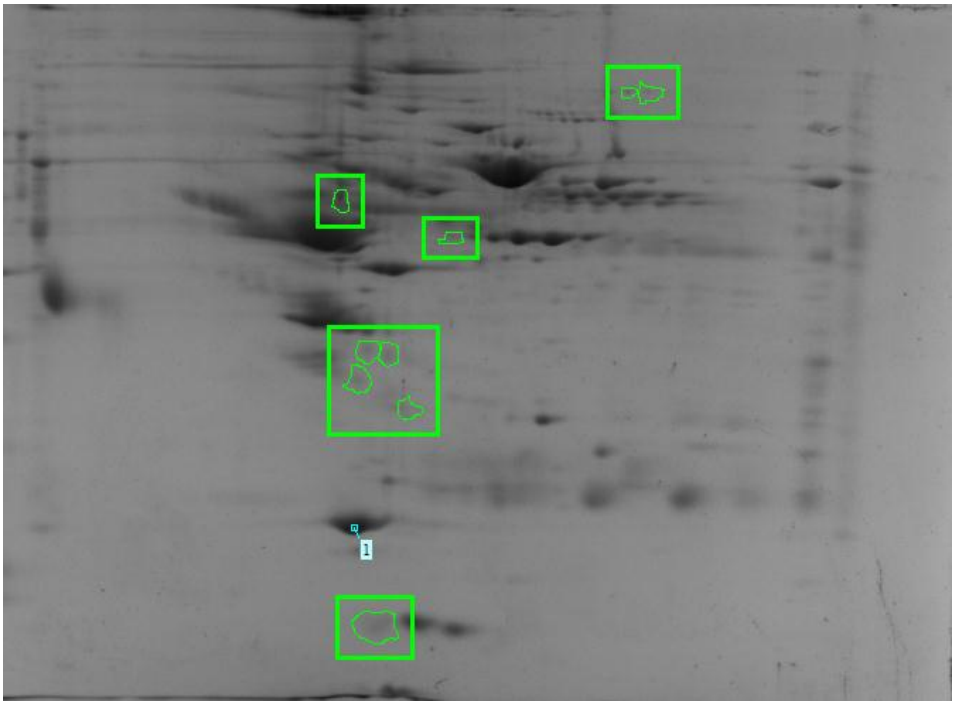


Figura 23. ***Spots de proteína únicos en plasma de médula ósea antes de la inducción.*** Con ANOVA $p \leq 0,05$.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. Cuantificación de proteínas en plasma sanguíneo y plasma de médula ósea

El contenido total de proteínas en el plasma sanguíneo para el grupo de niños que no presentaron la enfermedad (85,87mg/mL) fue mayor al observado para los plasmas de los pacientes diagnosticados con LLA (72,48mg/mL), que a pesar de ser pocas muestras, mantienen esta tendencia. Este contenido menor de proteína en los niños diagnosticados con LLA se podría explicar debido a alteraciones nutricionales en el desarrollo de la enfermedad. La concentración total en suero de albúmina, transferrina y pre-albúmina sirven de indicadores proteicos del estatus nutricional. Estudios hechos en pacientes recién diagnosticados con LLA han mostrado una baja concentración de albúmina y pre-albúmina en suero, esto concuerda con nuestros resultados en plasma. Interesantemente los niveles de estas proteínas se mantienen estables en pacientes con otros tipos de cáncer (Koskelo et al., 1991). De lo acuerdo a lo anterior, la disminución en el contenido de proteínas en suero o en plasma podrían servir como un factor de sospecha del desarrollo de una enfermedad sistémica como la leucemia.

Por otro lado, la concentración total de proteínas en el paciente diagnosticado con LLA es mayor antes del tratamiento de inducción (75,41mg/mL) en comparación con la misma muestra al finalizar este tratamiento (72,24 mg/mL). Esta misma tendencia se encontró en médula ósea (69,80mg/mL antes de la inducción y 61,84mg/mL después de la inducción). En la literatura se reporta un decrecimiento en la concentración de proteínas totales en suero, valores bajos estables de albúmina y niveles incrementados de pre-albúmina durante la terapia de inducción (Koskelo et al., 1991).

Los valores de concentración de proteínas en los plasmas de niños sanos vario en un rango de 71,80mg/mL – 99,36mg/mL (ver Tabla 3), de ahí el alto coeficiente de variación (10,51). Se debe tener cuidado al comparar estos valores obtenidos con valores de la literatura por 2 razones: 1) la concentración de proteínas totales en suero o plasma varía con parámetros como la edad, el sexo y patrones dietarios (Burki et al., 1996) y 2) depende del método de cuantificación y el patrón de proteína empleado. Por ejemplo, en estudios hechos en plasma de adultos, el contenido de proteínas en mg/mL utilizando como patrón de albúmina sérica bovina (BSA) varía de acuerdo al método de cuantificación utilizado, 80,9± 3,67 mg/mL para el método de Biuret, 82,6± 1,91 mg/mL para el método de Amido Black, 89,5± 3,10 mg/mL para el método de Bradford y 110,2± 4,09 mg/mL para el método de Lowry (Okutucu, 2007). A pesar que la cuantificación fue hecha por el método del BCA, los valores encontrados están dentro de estos rangos reportados.

Una dificultad adicional fue que la mayoría de reportes encontrados en la literatura están hechos en suero, ya que el estudio del plasma es relativamente nuevo. Así mismo, no se encontraron referencias acerca de contenido de proteínas en el plasma de médula ósea, probablemente por ser una muestra de menor accesibilidad con respecto al plasma sanguíneo y que solo se obtiene con fines diagnósticos.

8.2. Reducción de la complejidad del plasma sanguíneo y plasma de médula ósea

El perfil electroforético SDS-PAGE y bidimensional del plasma sanguíneo y del plasma de médula ósea mostraron un perfil en el cual la presencia de proteínas de alta abundancia se hace notoria, sugiriendo que estas proteínas saturan la carga posible del gel y de esta forma reducen la posibilidad de ver otras proteínas de menor abundancia separadas en el gel, además impide una adecuada separación de las proteínas, por tanto se redujo la complejidad de los plasmas sanguíneos y de médula ósea, para su análisis comparativo por 2DE.

De las dos estrategias utilizadas para este fin, se seleccionó la remoción de las dos proteínas más abundantes del plasma sanguíneo: albúmina e inmunoglobulina G mediante el sistema ProteoPrep® por encima del método de concentración de proteínas de baja abundancia del plasma por el sistema ProteoMiner™. Para tomar esta decisión, se analizaron las fracciones de menor interés de cada columna: fracción retenida para ProteoPrep® y fracción no retenida para ProteoMiner™ (Figura 7).

En la fracción retenida de ProteoPrep® la inmunodepleción resultó eficiente en la disminución de las proteínas abundantes seleccionadas. No se puede descartar la eliminación inespecífica de proteínas, ya que en esta estrategia, el uso de condiciones nativas conlleva que otras proteínas de baja abundancia puedan unirse de manera inespecífica a proteínas como la albúmina, siendo entonces depletadas (Surinova et al., 2011). A este respecto, el buffer de equilibrio en el cual se diluyó la muestra de plasma antes de su aplicación a la columna, es un buffer Tris de baja fuerza iónica y pH 7,4 que mantiene condiciones nativas del plasma durante la unión de albúmina e IgG a sus ligandos. Posteriormente en el paso de elución de las proteínas retenidas se utiliza un buffer de alta fuerza iónica y condiciones desnaturalizantes, este es el buffer de extracción que contiene: 40 mM Trizma Base, 7.0 M urea, 2.0 M tiourea, y detergente C7BzO al 1%, pH 10.4. En estas condiciones, las posibles proteínas retenidas unidas a albúmina deben separarse de esta. Sin embargo no se observaron en los geles SDS-PAGE y 2DE, este tipo de proteínas, a pesar de usar tinción con plata altamente sensible.

En contraste con ProteoPrep®, la fracción no retenida de la columna ProteoMiner™, tuvo un perfil proteico complejo y que en el momento no se sabe que proteínas se están eliminando, y por tratarse este de un estudio de tipo observacional; no se recomienda usar este acercamiento.

Aunque en el campo de la proteómica se encuentra gran número de trabajos en donde la inmunodepleción de proteínas de alta abundancia se utiliza, las propuestas consideran desde la remoción de albúmina (Steel, 2003) hasta la remoción de las 20 proteínas más abundantes del plasma (Millioni et al., 2011), esta última, que utilizan anticuerpos específicos pueden potencialmente retener de manera inespecífica mayor cantidad de proteínas que el acercamiento utilizado en este trabajo. En este trabajo nos ajustamos al criterio que a mayor número de proteínas a depletar mayor posibilidad de artefactos y pérdidas proteicas.

De los sistemas utilizados, el ProteoMiner™ genera una recuperación de tan solo del 2% de la muestra original, sugiriendo que es efectiva en reducir el rango dinámico de proteínas si se asume que la eliminación se da por selectividad y no por pérdidas de muestra durante el procesamiento. Esto implica también que el volumen de muestra inicial requerido pueda convertirse en una limitante del método. En comparación, la eliminación del 67% del total proteico en ProteoPrep®,

concuerda con los contenidos reconocidos para las proteínas albúmina e IgG en plasma (Rengarajan et al., 1996), lo cual aporta un nivel de confianza en el procesamiento por este sistema. Las fracciones retenidas del sistema, pueden ser usadas en proyectos cuyo fin sea el estudio de cambios en los niveles de albúmina e IgG o aislamiento de anticuerpos presentes en la muestra para etapas posteriores de validación que no son del alcance de este trabajo, pero que sería interesante observar dados los eventos en la patología.

8.3. Selección de las condiciones óptimas para la electroforesis bidimensional

En la primera parte de este trabajo se implementó un protocolo para la obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo, y posteriormente se aplicó este a un grupo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B.

Una vez se reduce la complejidad del plasma sanguíneo, la obtención de geles bidimensionales resueltos depende de variables experimentales entre las que se destacan, el método de precipitación y la naturaleza del buffer con el que se disuelven las proteínas para su separación mediante el enfoque isoeléctrico. En nuestro grupo de investigación se ha notado que es necesario el ajuste de estas condiciones de acuerdo al tipo de muestra, dadas las características de solubilidad y complejidad del plasma.

Nuestros resultados encontraron una mejor resolución por efecto de la precipitación con TCA/acetona, resultado que concuerda con el reporte hecho por otros autores para este tipo de muestra (Ahmad et al., 2009).

Se descartó el acople directo entre la inmunodepleción y el enfoque isoeléctrico evitando la precipitación y posterior disolución de proteínas, que podría tener un efecto beneficioso evitando perdidas de proteína durante la precipitación y posterior solubilización, sin embargo; esta metodología afectó considerablemente la resolución de los perfiles bidimensionales debido a la presencia de componentes no proteicos como lípidos y sales en el plasma (Shaw et al., 2003).

Para el buffer de re-disolución se obtuvieron mejores imágenes de los geles bidimensionales con la variante urea7M/tiorea2M en comparación con solo urea, la tiourea se recomienda ser usada junto con altas concentraciones de urea, para aumentar la solubilidad de la tiourea, esta combinación aumenta la recuperación de proteínas en geles 2DE por una mejor solubilización de las mismas, esta combinación de caotropos es preferible al usar tiras IPGs las cuales son propensas a perdidas por baja absorción de proteínas hidrofóbicas e isoeléctricamente neutras (Molloy, 2000).

Como se esperaba, la aplicación del programa de enfoque isoeléctrico requirió de optimización para generar geles resueltos. Se encontró que con 10000V/h en el paso de enfoque se obtiene una resolución en los geles bidimensionales, este voltaje además es el recomendado por los fabricantes de las tiras IPGs (Bio-Rad) en las que se recomienda su uso al límite de voltaje permitido para obtener un enfoque adecuado. Cabe resaltar que valores de voltaje más altos afectan esta resolución por posible sobre-enfoque de proteínas que puede causar degradación de las mismas y daño físico de las tiras IPGs (resultados no mostrados).

El método de tinción seleccionado para la visualización de proteínas en los geles bidimensionales fue la tinción con azul de Coomassie (CBB), que por tratarse de una tinción de punto final genera menor ruido de fondo y pocas señales inespecíficas al contrario que la tinción con plata, cuyo método resultó menos reproducible debido a que el punto final es subjetivo, y se debe detener la reacción para evitar que se manche completamente el gel como se observa en la Figura 5B, de este modo fue más complicado tener bajo control este parámetro que afecta la reproducibilidad en esta tinción en contraste con la tinción con azul de Coomassie, en donde los geles se dejaron teñir por un periodo de 3 días hasta alcanzar el punto final. Además de lo anterior esta tinción es más sencilla técnicamente, más amigable con el ambiente y relativamente más económica.

Sin embargo, a pesar de usar tinción CBB coloidal que es de mayor sensibilidad que la tinción clásica con CBB, esta sigue siendo la de menor sensibilidad que la mayoría de métodos de tinción empleados en 2DE para proteómica (Tambor et al., 2010), por tanto sería interesante evaluar otras tinciones más sensibles como la tinción fluorescente (por ejemplo *Sypro Ruby* o *Deep Purple*).

Otro aspecto que causa controversia entre la comunidad científica que trabaja en 2DE es el formato del gel. En este trabajo se ensayó la identificación de proteínas en geles en formato pequeño de 7cm y en geles en formato grande de 18cm. Cuando se realizó el procedimiento de digestión tríptica, análisis de masas e identificación mediante bases de datos, para ambos formatos se obtuvo identificación confiable de proteínas típicas del plasma sanguíneo, esta confidencia está dada por un alto *score* y por lo menos 2 péptidos (# *match*) asignados a cada proteína en la identificación por Mascot (Tablas 8 y 9). Aunque los geles en formato grande pueden aumentar la presencia de proteínas en menor abundancia que alcancen el límite de detección de la tinción con Coomassie; esto no se observó al comparar el perfil proteico entre geles de 7cm y 18cm. Es de anotar que obtener estos geles grandes generaría algunas limitaciones técnicas como la cantidad de proteína necesaria para obtener duplicado o triplicados por muestra que no compensan con ganancia en sensibilidad o resolución.

8.4. Comparación de plasma sanguíneo de niños sanos y diagnosticados con LLA-B

Una limitación grande en el trabajo es contar con un número bajo de muestras de LLA del tipo B. Motivos diversos contribuyeron a la poca recolección de muestras, y entre las recolectadas, el porcentaje mayor correspondieron a leucemias del tipo T. Es de anotar, que al momento de acceder a los pacientes, éstos se encuentran con sospecha de leucemia, y la muestra se recoge sin conocer si corresponde a una leucemia aguda y qué tipo B o T, por tanto es necesario esperar los análisis de médula ósea para su confirmación.
Otro inconveniente a resaltar, es que muchos de los pacientes remitidos al centro de recolección habían empezado o recibido algún tratamiento primario de remisión, por lo cual no pueden ser tenidos en cuenta al no cumplir los criterios de inclusión de este estudio.

Lo anterior, apoya hipótesis que los investigadores en las diferentes instituciones vinculadas al proyecto han venido manifestando, relacionadas con la necesidad de estudios de epidemiología de casos de cada leucemia y subregistro de casos por falta de diagnóstico, focalización de lugares iniciales de tratamiento, y casos de tratamiento descontinuado a causa de eventos psicosociales. En este orden de ideas, se reconoce el estado exploratorio de este trabajo.

Se utilizó un grupo de 6 plasmas sanguíneos de niños considerados como individuos sanos, que acudieron a consulta médica para exámenes de control y reportaron no presentar condiciones patológicas al momento de la toma de muestra. Aunque no se tomó en cuenta la historia clínica de estos menores, para saber si cerca a la toma de la muestra habían padecido de alguna enfermedad o en el momento de la toma de la muestra estar tomando algún medicamento que podría afectar la expresión de proteínas del plasma. Eventos que se sugieren sean considerados para recolecciones posteriores. No obstante lo anterior, la variabilidad biológica reflejada en los geles de muestras de niño sanos no supera la incertidumbre de la técnica de separación, lo cual mantiene las posibilidades de estratificación de tratamientos (ver análisis de imágenes).

8.5. Análisis de imágenes de geles de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B

A pesar que no se contó con igual número de muestras para los grupos de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B, se realizó el análisis de imágenes preliminar con estas muestras. Para reducir la complejidad del análisis de imágenes, se optó por hacer dos ensayos: 1) las 6 muestras de niños sanos y una imagen por cada muestra y 2) 3 muestras de niños sanos y dos imágenes por cada muestra. El segundo acercamiento en el cual se tiene en cuenta tanto la variabilidad técnica entre cada muestra individual como la variabilidad biológica entre las 3 muestras mostró mejor emparejamiento entre las imágenes que el primer acercamiento en el cual solamente se tiene en cuenta la variabilidad biológica (resultados no mostrados).

Se hizo un análisis de la variabilidad técnica (diferencias entre duplicados de una misma muestra) y de la variabilidad biológica en las muestras control (diferencias entre muestras pertenecientes a un mismo grupo y grupos diferentes), con el fin de validar técnica comparativa de imágenes. Para esto se usó el parámetro *scatter plot*, el cual sirve para analizar similaridades o variaciones en los geles como por ejemplo disparidades en la intensidad de la tinción o carga de muestra. Esta relación se muestra por una gráfica de dispersión, donde los datos de valores de *spot* se ajustan a una regresión lineal entre los geles que se están comparando. De esta grafica se obtiene una ecuación lineal de la forma ($1{,}0 \times x + 0$) en donde si la ecuación se aleja de esta identidad indica menor correlación entre los dos geles, también se obtiene un coeficiente de correlación (*Corr*) el cual puede variar entre -1 y +1, donde un valor absoluto cercano a 1 indica que los datos están altamente correlacionados o sea que los geles se parecen más. Estos valores de *Corr* entre los duplicados de cada muestra control se muestra en la Tabla 19, en la cual se puede observar que este valor varía entre 0,90 y 0,98 indicando una variabilidad de aproximadamente el 10%. Por otra parte estos valores haciendo la comparación entre un gel referencia control (control 7) en comparación con los otros geles control y los geles de las muestras de LLA (Tabla 20) muestra que estos valores varían entre 0,82 y 0,92 lo que indica una variación aproximada del 20%. Esto quiere decir que la variabilidad técnica entre duplicados es menor que la variabilidad biológica entre las muestras. Por otra parte la variabilidad técnica y biológica es similar entre los controles y los casos de LLA por lo cual no se pueden diferenciar entre los geles pertenecientes a controles o casos de LLA.

Gel 1-gel 2	Ecuación	*Corr*
Niño sano 5 gel 1- gel 2	0,872X + 0.0886	0, 9430
Niño sano 7 gel 1- gel 2	0,976X + 0.00488	0, 9034
Niño sano 10 gel 1- gel 2	1,01X - 0.0302	0, 9853
LLA 3 inicio inducción gel 1-gel 2	0,951X + 0.0114	0, 9195
LLA 3 fin inducción gel 1- gel 2	1,02X + 0.025	0, 9303

Tabla 19. Valores de correlación (*Corr*) entre geles duplicado de muestras de plasma sanguíneo.

Gel 1-gel 2	Ecuación	*Corr*
Niño sano 7 gel 1- Niño sano 5 gel 1	1X - 0.0717	0, 8926
Niño sano 7 gel 1- Niño sano 5 gel 2	0,922X + 0.0725	0, 8557
Niño sano 7 gel 1- Niño sano 10 gel 1	0,878X + 0,0671	0, 8206
Niño sano 7 gel 1- Niño sano 10 gel 2	0,892X + 0,0211	0, 8208
Niño sano 7 gel 1- LLA 3 inicio inducción gel 1	0,977X - 0.0386	0, 8449
Niño sano 7 gel 1- LLA 3 inicio inducción gel 2	0,928X - 0.0291	0, 8627
Niño sano 7 gel 1- LLA 3 fin inducción gel 1	0,712X + 0.137	0, 9282

Tabla 20. Valores de correlación (*Corr*) entre geles de las muestras del grupo control y el grupo de pacientes.

El análisis de geles hecho para las muestras de plasma sanguíneo de niños sanos y niños diagnosticados con LLA-B mostró que existe alta correlación entre todos los geles, es decir que el programa Melanie 7.0 no puede distinguir entre los geles pertenecientes a los diferentes grupos, dado por los porcentajes de *match* que se encontraron entre los controles y que fueron similares para la muestra de LLA-B (Tabla 11). Además, el análisis de factores mostró a los geles de los niños sanos y el niño diagnosticado con LLA-B antes del tratamiento de inducción como una sola población (geles agrupados), esto se debe a que no existen spots únicos en el grupo de niños sanos o la muestra de LLA-B antes del tratamiento de inducción que permitan discriminarlos entre sí. En contraste, los geles pertenecientes a la muestra de LLA-B después de la inducción se separan de las demás muestras, lo que indica que el programa logra distinguir estos geles como diferentes en comparación a los demás. Los spots que permiten diferenciarla esta muestra de los demás geles son spots únicos y resaltan la viabilidad de encontrar proteínas, por esta estrategia, que caractericen este estadio del paciente y podrían tener relevancia patológica en el desarrollo de la enfermedad.

Cabe aclarar que los resultados del análisis factorial no se deben interpretar en el sentido que no es posible el análisis comparativo, se interpreta como que las diferencias están más enfocadas en cambios en la intensidad de spots compartidos entre los grupos. Por tanto en el análisis de clases en plasma sanguíneo se tomaron en cuenta aquellos spots presentes en todas las muestras pero que reflejaran un cambio significativo estadísticamente en la intensidad. Este valor se estableció con un corte (*fold*) en 3, por encima del valor normalmente aceptado (*fold* 2), con el fin de encontrar diferencias más significantes en proteínas con expresión diferencial observable, con miras a que los cambios puedan ser medibles en diversas técnicas y esperando que tengan un mayor margen de confiabilidad estadística al aumentar el número de muestras. Bajo este criterio comparativo se logró identificar 21 spots de proteína entre los 3 grupos estudiados.

8.6. Análisis de proteínas con expresión diferencial en plasma sanguíneo

De las proteínas que mostraron expresión diferencial entre los tres grupos se logró identificar con certeza 5 proteínas (Tabla 14), estas proteínas pueden de manera directa o indirectamente relacionarse con el desarrollo de la enfermedad, por tanto se consolido la información referente a función de cada proteína identificada y su posible papel en carcinogénesis.

Por ejemplo, la Proteína de unión a vitamina D, encontrada diferencial en plasma sanguíneo, en general; se encuentra incrementada en niños en comparación con adultos y su alta concentración circulante de esta proteína se ha relacionado con menor riesgo de enfermedades crónicas como diversos tipos de cáncer y enfermedades cardiacas (Holick, 2007).

Como se puede observar en Tabla 21, se encontraron proteínas diferenciales relacionadas con metabolismo lipídico como las apolipoproteinas E (APOE) y A1 (APOA1), proteínas relacionadas con respuesta inmune como la proteína de unión a vitamina D (VTDB), el componente del complemento C4 (CO4A) y la glicoproteína acida 1-alfa (A1AG1), esta última también funciona como proteína transportadora del torrente sanguíneo.

Ya son bien conocidas las alteraciones metabólicas en los pacientes neoplásicos que incluyen el metabolismo de grasas, las células cancerígenas utilizan muy poco los lípidos ya que en estadios de células cancerígenas poco diferenciadas mayoritariamente usan glucosa como sustrato energético.

Estudios epidemiológicos han indicado relación entre los lípidos en suero y cáncer, y es posible que anormalidades en lípidos estén involucrados en el mecanismo de oncogénesis. Estudios hechos en pacientes diagnosticados con LLA antes del tratamiento de inducción (Moschovi et al., 2004) han mostraron patrones alterados de lípidos en suero que consistieron en niveles muy bajos de colesterol de alta densidad y niveles elevados de triglicéridos y colesterol de baja densidad, estos niveles volvieron a niveles normales durante el tratamiento de inducción. Estos resultados sugieren que hay una alteración en lípidos en pacientes diagnosticados con LLA, que también fueron medibles a niveles de Apolipoproteinas involucradas en el metabolismo de lípidos por 2DE en este trabajo. También se ha encontrado niveles bajos de ApoA1 en pacientes diagnosticados con LLA, estos niveles volvieron a los normales después del tratamiento de inducción (Halton et al., 1998)

La Glicoproteína acida 1-alfa, aunque no fue directamente detectada por MS, es una proteína de mucho interés ya que es una importante proteína del plasma involucrada en la unión y transporte de muchos fármacos, especialmente compuestos básicos, esta proteína tiene características únicas de unión a fármacos que la diferencian de la albumina. Su concentración en plasma es relativamente baja y se ha relacionado como una proteína de fase aguda, incrementándose su concentración en enfermedades como el cáncer y otras enfermedades inflamatorias (Huang et al., 2013). Es este estudio también se encontró incrementada esta proteína en la muestra de leucemia con respecto a los controles, esta proteina puede ser tenida en cuenta como potencial biomarcador de leucemia aguda. Adicionalmente dadas sus particulares características de unión de fármacos podrían hacerse estudios relacionados con farmacocinética y de esta proteína con los fármacos empleados durante la fase de inducción.

Proteína	*Función**	*Posible Papel en cáncer*	*Niveles de expresión*
Proteína de unión a vitamina D (VTDB_HUMAN) DBP	En plasma esta transporta esteroles de vitamina D y previene la polimerización de actina por unión a sus monómeros. DBP se asocia con inmunoglobulina de membrana en la superficie de linfocitos B y con el receptor Fc de IgG en la membrana de linfocitos T.	Estudios han mostrado que uno de sus productos, DBP-factor activador de macrófagos (DBP-maf) tiene actividad anti angiogénica y anti tumoral en células de cáncer de próstata (Gregory et al., 2010).	Se encontró disminuida en la muestra de LLA antes de la inducción (0,16) con respecto a los controles (0,54).
Apolipoprotein a E (APOE_HUMAN)	Media en la unión, internalización y catabolismo de las partículas de lipoproteínas. Puede servir como un ligando para el receptor LDL (de apo B /E) y para el receptor especifico de Apo-E (remanente de quilomicrones) de los tejidos hepáticos.	Esta proteína ha sido recientemente identificada como un potencial marcador tumoral en cáncer de ovario. Proteína involucrada en varias cascadas de señalización que pueden ser críticas en la regulación de la proliferación y supervivencia de células cancerígenas. (Yu-Chi et al., 2005).	Se encontró disminuida en la muestra de LLA antes de la inducción (0,073) con respecto a los controles (0,17).
Componente C4A (CO4A_HUMAN)	Componente no enzimático de las convertasas C3 y C5 y por tanto esencial para la propagación de la señalización clásica del complemento, se une covalentemente a inmunoglobulina y complejos inmunes y aumenta la solubilización de agregados inmunes. C4A es requerido para unión efectiva mediante puentes amida a agregados inmunes o antígenos proteicos.	Se ha observado una disminución significativa de la actividad de la vía clásica, los componentes C3 y C4 en pacientes con leucemia promielocitica que presentan coagulación intravascular diseminada (Villaescusa et al., 1999)	Se encontró disminuida en la muestra de LLA antes de la inducción (0,23) con respecto a los controles (0,60).
Apolipoprotein a A-1 (APOA1_HUMAN)	Participa en el transporte inverso de colesterol desde los tejidos al hígado para su excreción, actúa como un cofactor para la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Como parte del complejo SPAP, activa la motilidad de los espermatozoides.	APOA1 posee propiedades anti inflamatorias y anti oxidantes, se ha planteado que niveles reducidos de APOA1 en pacientes de cáncer de ovario podría ser causal de la progresión de la enfermedad (Su et al., 2010).	Se encontró disminuida en la muestra de LLA antes de la inducción (0,16) con respecto a los controles (0,25).
Glicoproteína acida 1-alfa (A1AG1_HUMAN)	Funciona como proteína de transporte en el torrente sanguíneo. Une varios ligandos en el interior de su dominio barril beta. Aparece como moduladora de la actividad del sistema inmune durante la fase de reacción aguda.	Esta proteína plasmática de unión y transporte de fármacos se eleva en procesos inflamatorios y enfermedad incluyendo el cáncer (Baumann et al., 1990).	Se encontró incrementada en la muestra de LLA antes de la inducción (9,4) con respecto a los controles (0,98).

*Consultado en base de datos UniProt *(http://www.uniprot.org/)*

Tabla 21. Función biológica y posible papel en cáncer de proteínas con expresión diferencial entre niños sanos y pacientes con LLA.

8.7. Obtención geles bidimensionales de plasma de médula ósea de niños diagnosticados con LLA-B

Aunque es claro que el estudio del plasma de médula ósea en este trabajo no fue para la búsqueda de biomarcadores de LLA-B directamente, debido a que su obtención requiere metodologías invasivas y dolorosas para los pacientes, su adquisición se espera provea validación de potenciales biomarcadores hallados en plasma sanguíneo, que pueden ser proteínas secretadas de médula ósea al torrente sanguíneo.

El plasma de médula ósea requirió un tratamiento similar al plasma sanguíneo en cuanto a reducción de la complejidad se refiere, interesantemente ambos fluidos tienen un perfil 2DE muy similar (Figuras 10 y 20). Para obtener los geles bidimensionales de plasma de médula ósea, se implementaron las mismas condiciones ya optimizadas para el plasma sanguíneo obteniéndose buenos resultados en cuanto a resolución de los geles 2DE. Para este análisis se obtuvieron triplicados para cada muestra: LLA-B antes del tratamiento de inducción y LLA-B después del tratamiento de inducción.

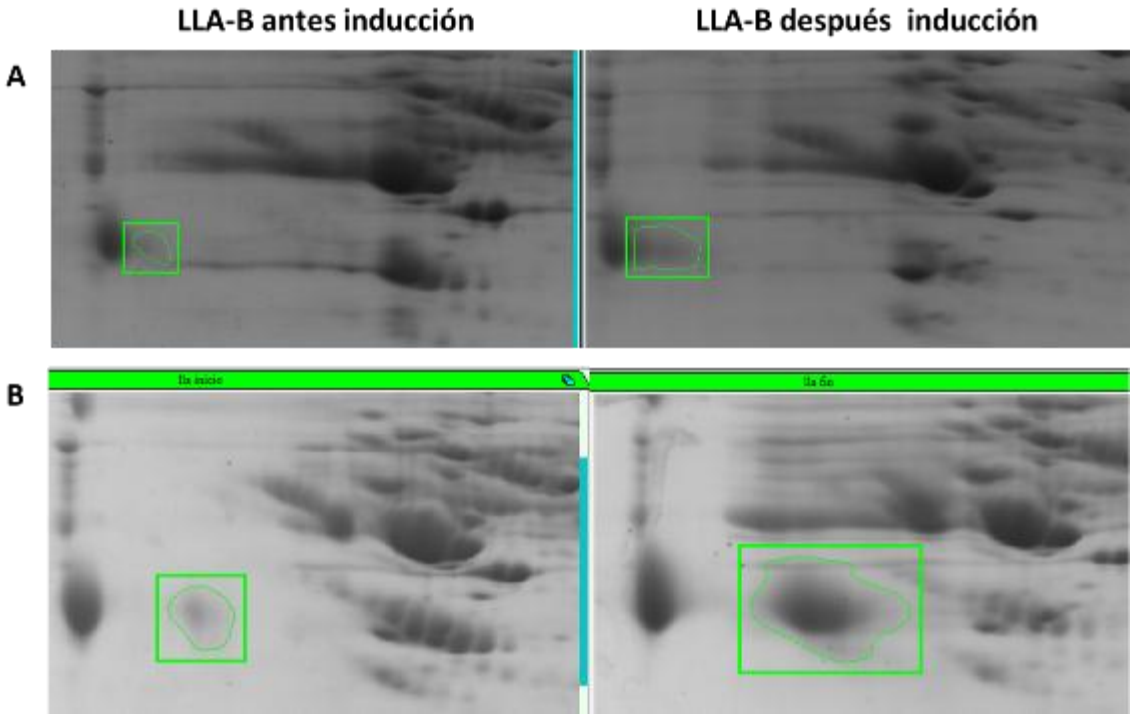


Figura 24. ***Ampliación de geles que muestran spots de proteína con expresión diferencial para la muestra de LLA-B antes y después del tratamiento de inducción en plasma de médula ósea (A) y plasma sanguíneo (B).***

No se encontró en la literatura estudios por electroforesis bidimensional del plasma de médula ósea, debido quizás a lo mencionado anteriormente. Adicionalmente a la validación de biomarcadores, esta muestra podría servir para identificar cambios en los perfiles de expresión proteica debido al tratamiento de inducción en el sitio primario de surgimiento de las células

leucémicas, y poder estudiar mecanismos de acción de los medicamentos o mecanismos de resistencia a estos y poder servir como factores diagnósticos de respuesta al tratamiento.

Una comparación preliminar entre los geles de plasma sanguíneo y medula ósea de la muestra de LLA antes y después del tratamiento de inducción, permitió identificar algunos spots de proteína que conservan una expresión diferencial en plasma y en médula (Figura 24). En particular, el spot identificado en plasma como la glicoproteína acida 1- alfa (Figura 17) fue también variable en médula ósea, así pues la expresión de esta proteína puede ser estudiada como potencial biomarcador en un grupo mayor de muestras de LLA-B y mediante técnicas analíticas que permitan la cuantificación de su expresión.

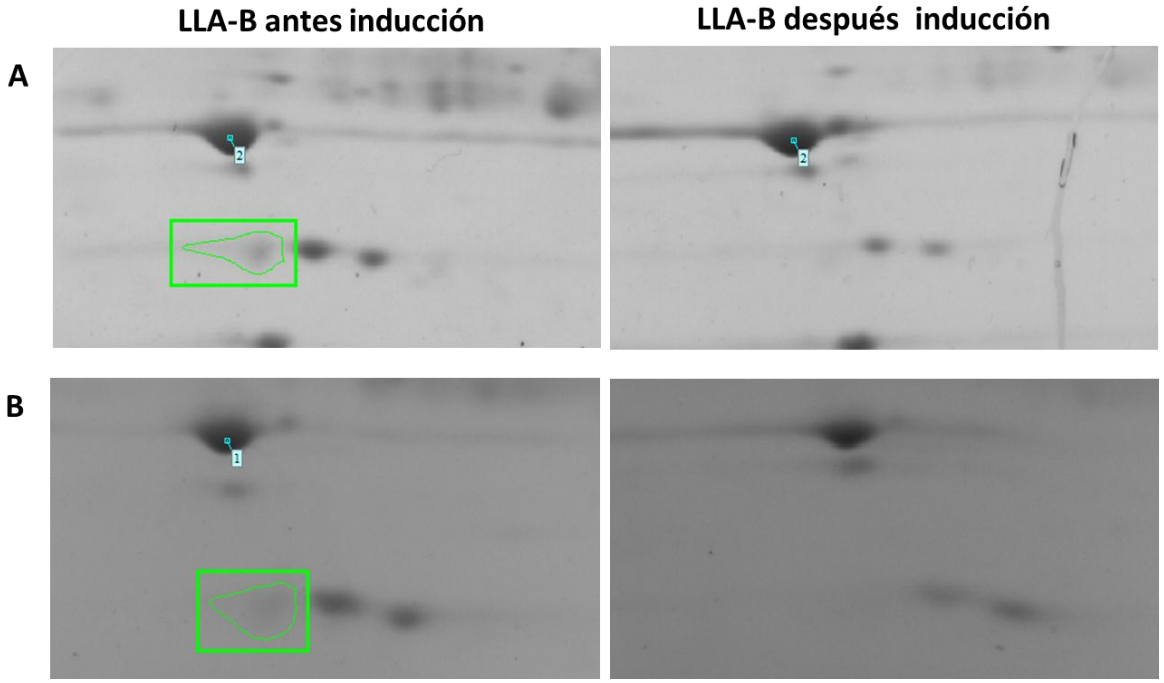


Figura 25. ***Ampliación de geles que muestran spots de proteína con expresión única para la muestra de LLA-B antes del tratamiento de inducción en comparación con esta misma después al final del tratamiento, en plasma sanguíneo (A) y plasma de médula ósea (B).***

Por otra parte, un spot de proteína identificado como único (Match ID 96 en plasma sanguíneo y 93 en médula ósea) se mantiene en estos dos tejidos en la muestra antes de la inducción con respecto al final de la inducción (Figura 25). Esta proteína puede estar relacionada con la biología propia de la enfermedad o mecanismos de respuesta al tratamiento de inducción y puede ser estudiada para evaluar su potencial como un factor pronóstico de respuesta a esta fase del tratamiento.

En resumen, este trabajo permitió obtener de manera resuelta y reproducible geles bidimensionales de proteomas de pacientes diagnosticados con LLA. No obstante, genera como perspectiva el obtener proteomas para un grupo mayor de muestras de LLA-B, con el propósito de validar los resultados encontrados en este trabajo. Así como, permitir la identificación de todas las proteínas que presentaron expresión diferencial tanto en plasma sanguíneo como en médula ósea. Estas

podrían tener potencial aplicación como biomarcadores o como proteínas claves que permitan entender mejor el proceso de leucogénesis. Sería interesante realizar proteómica comparativa a nivel cuantitativo de las proteínas identificadas como diferenciales en plasma sanguíneo para evaluar su potencial como biomarcadores de esta enfermedad.

Aunque en este trabajo se generó una fracción rica en albúminas e inmunoglobulinas como es la fracción retenida de los plasmas por el sistema ProteoPrep®, no se procesó. Es de resaltar que en ella se podrían evaluar los cambios en los niveles de albúmina e IgG que pueden relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. De la misma forma, esta fracción retenida puede servir para el aislamiento de anticuerpos presentes en la muestra para etapas posteriores de validación.

9. CONCLUSIONES

1. Se estableció que la separación de proteínas del plasma sanguíneo y plasma de médula ósea mediante SDS-PAGE y 2DE requiere reducir su complejidad para la realización de estudios de proteómica comparativa entre pacientes diagnosticados con LLA y controles sanos.
2. Se seleccionó la inmunodepleción de dos proteínas de alta abundancia del plasma sanguíneo, albúmina e IgG, por encima del enriquecimiento de proteínas de baja abundancia para reducir la complejidad del proteoma del plasma.
3. Se seleccionaron las condiciones óptimas para la obtención de geles bidimensionales de plasma sanguíneo: precipitación de proteínas con TCA/acetona, disolución en buffer que contiene urea 7M/tiourea 2M, separación de proteínas en el enfoque isoeléctrico hasta 10 000V/h y tinción con azul de Coomassie coloidal G-250.
4. Se obtuvieron geles bidimensionales de plasma sanguíneo y de médula ósea para un grupo de niños sanos y una muestra de un paciente diagnosticado con LLA-B antes y después del tratamiento de inducción.
5. Mediante análisis comparativo de imágenes se logro identificar diferencias entre pacientes y controles y entre pacientes antes y después del tratamiento de inducción, tanto en plasma sanguíneo como en plasma de médula ósea.
6. Se identificaron, de manera preliminar, mediante espectrometría de masas y análisis bioinformático algunas de las proteínas expresadas diferencialmente entre pacientes y controles.

10. PERSPECTIVAS

1. Obtener geles bidimensionales para un grupo mayor de muestras de niños diagnosticados con LLA-B, con el propósito de validar los resultados encontrados en este trabajo.
2. Identificar todas las proteínas que presentaron expresión diferencial tanto en plasma sanguíneo como en médula ósea. Estas podrían tener potencial aplicación como biomarcadores o como proteínas claves que permitan entender mejor el proceso de leukogenesis.
3. Realizar proteómica comparativa a nivel cuantitativo de las proteínas identificadas como diferenciales en plasma sanguíneo para evaluar su potencial como biomarcadores de esta enfermedad.
4. Estudiar las fracciones retenidas de los plasmas por el sistema ProteoPrep®, Evaluar los cambios en los niveles de albúmina e IgG que pueden relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. Esta fracción retenida pueden servir para el aislamiento de anticuerpos presentes en la muestra para etapas posteriores de validación.

11. **BIBLIOGRAFIA**

1. Aebersold R, Goodlett DR. (2001) Mass spectrometry in proteomics. Chem. Rev. 101, 269–295, 2001
2. Aebersold R, Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198–207 (2003).
3. Ahmad Y, Sharma N. (2009) An Effective Method for the Analysis of Human Plasma Proteome using Two-dimensional Gel Electrophoresis. J Proteomics Bioinform 2 495-499.
4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: American Cancer Society; 2011.
5. Anderson NL, Anderson NG. (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol. Cell Proteomics. 1, 845-867.
6. Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, Carroll WL, Conter V, GalimbertI S, et al. (2010) Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. J Clin Oncol. 2010 Nov 1;28(31):4755-61.
7. Ballesteros A, Vizcaíno M. (2013) Guías de Práctica Clínica leucemias y linfomas. 2013 Guía No.9. Ministerio de Salud y Protección Social - Colciencias.
8. Baumann H, Gauldie J. (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and others mediators of inflammation. Mol Biol Med. 1990;7:147-159.
9. Belson M, Kingsley B, Holmes A. (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. Environ. Health Perspect. 115, 138-145.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33:451–458.
11. Boschetti E, Righetti P. (2008). Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. BioTechniques 44:663–665
12. Braoudaki M, Lambrou G, Vougas K, Karamolegou K, Tsangaris G, Tzortzatou F. (2013) Protein biomarkers distinguish between high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. Journal of Hematology & Oncology 6, 52.
13. Burki M, Yousaf M, Orakzai SA. (1996) Serum proteins electrophoresis in infants and children. J Pak Med Assoc. 1996 Nov;46(11):252-5.
14. Castro M, Orozco L, Rueda E, Suárez A (2007) Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda en pediatría: incidencia, mortalidad y asociaciones causales: Centro de investigaciones epidemiológicas. Universidad Industrial de Santander 2007, 116-123.
15. Chen YY, Lin SY, Yeh YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, Wang AH. (2005) A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. Electrophoresis 26, 2117-2127.

16. Escherich G, Horstmann MA, Zimmermann M, Janka-Schaub GE, et al. (2010) Cooperative study group for childhood. Acute lymphoblastic leukaemia (COALL). Leukemia. 2010 Feb; 24(2):298-308.
17. Fajardo A. (2005) Mortalidad por cáncer en niños. Bol. Med Hosp Infant Mex. 62, 1-3.
18. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. (1989) Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. Science 246, 64–71, 1989.
19. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. (2002) Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5.
20. Fountoulakis M, Gasser R. (2003) Proteomic analysis of the cell envelope fraction of Escherichia coli. Amino. Acids 24, 19-41.
21. Garfin DE. (2003) Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. Trends in Analytical Chemistry 22, 263-272.
22. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. (2004) Current 2D electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4, 3665-3685.
23. Graux C. (2011) Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. Transfus. Apher. Sci. 44, 183-189.
24. Greaves M. (1999) Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. Eur J Cancer 1999;35:1941–1953.
25. Gregory KJ, Zhao B, Bielenberg DR, Dridi S, Wu J, et al. (2010) Vitamin D binding protein-macrophage activating factor directly inhibits proliferation, migration, and uPAR expression of prostate cancer cells. PLoS One. 2010 Oct 18;5(10):e13428. doi: 10.1371/journal.pone.0013428.
26. Guerrier L, Claverol S, Fortis F, Rinalducci S, timperio AM, Antonioli P, Jandrot-Perrus M, Boschetti E, Righetti PG. (2007) Exploring the platelet proteome via combinatorial, hexapeptide ligand libraries. J Proteome. Res. 6, 4290-4303.
27. Halton JM, Nazir DJ, McQueen MJ, Barr RD. (1998) Blood lipid profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer. 1998 Jul 15;83 (2):379-84.
28. Hegedus C, Gunn L, Skibola C, Zhang L, Shiao R, Fu S, Dalmasso E, Metayer C, Dahl G, Buffler P, Smith M. (2005) Proteomic analysis of childhood leukemia. Leukemia 19, 1713-1718.
29. Holick M. (2007) Vitamin D deficiency. N Engl J Med 357: 266–281.
30. Huang Z, Ung T. (2013) Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. Curr Drug Metab. 2013 Feb;14(2):226-38.
31. Ignjatovic V, Lai C, Summerhayes R, Mathesius U, Tawfilis S, et al. (2011) Age-Related Differences in Plasma Proteins: How Plasma Proteins Change from Neonates to Adults. PLoS ONE 6(2).
32. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 61, 69-90.
33. Jiang N, Kham S, Koh G, Suang J, Ariffin H, Chew F, Yeoh A. (2011) Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). J Proteomics. 74, 843-857.

34. Kim H, Kim M, So E, Kim C. (2007) Comparison of proteomes in various human plasma preparations by two-dimensional gel electrophoresis. J Biochem. Biophys. Methods 70, 619-625.
35. Koskelo EK, Saarinen UM, Siimes MA. (1991) Low levels of serum transport proteins indicate catabolic protein status during induction therapy for acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol. 1991 Jan-Mar;8(1):53-9.
36. Leger T, Lavigne D, Le Caer J, Guerrier L, Boschetti E, Fareh J, Feldman L, Laprevote O, Meilhac O. (2011) Solid-phase hexapeptide ligand libraries open up new perspectives in the discovery of biomarkers in human plasma. Clin. Chim. Acta 412, 740-747.
37. Ludwig WD, Raghavachar A, Thiel E.(1994) Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukaemia. Baillieres Clin Haematol 1994;7:235–262.
38. Luque J, Neubert T. (2007) Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. J Chromatogr. A 1153, 259-276.
39. Mann M. (1996) A shortcut to interesting human genes: peptide sequence tags, expressed-sequence tags and computers. Trends Biochem. Sci. 21, 494-495.
40. Medzihradszky KF, et al. (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a highperformance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. Anal. Chem. 72, 552–558 (2000)
41. © Ministerio de Salud y Protección Social – Colciencias Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de Leucemia Linfoide Aguda y Leucemia Mieloide Aguda en niños, niñas y adolescentes. Guía No. 9 ISBN: 978-958-8838-11-3 Bogotá. Colombia. Abril de 2013.
42. Millioni R, Tolin S, Puricelli L, Sbrignadello S, Fadini GP, et al. (2011) High Abundance Proteins Depletion vs Low Abundance Proteins Enrichment: Comparison of Methods to Reduce the Plasma Proteome Complexity. PLoS ONE 6(5): e19603. doi:10.1371/journal.pone.0019603
43. Molloy MP. (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. Anal Biochem. 280, 1-10.
44. Moschovi M, Trimis G, Apostolakou F, Papassotiriou I, Tzortzatou-Stathopoulou F. (2004) Serum lipid alterations in acute lymphoblastic leukemia of childhood. J Pediatr Hematol Oncol. 2004 May;26(5):289-93.
45. Mostovenko E, Scott HC, Klychnikov O, Dalebout H, Deelder AM. (2012) Protein Fractionation for Quantitative Plasma Proteomics by Semi-Selective Precipitation. J Proteomics Bioinform 5, 217-221.
46. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255-262.
47. Novoa S. (2013) POE-PII 2 Protocolo de extracción y cuantificación de proteínas para el área proteómica. Laboratorio de Investigación en Hormonas Departamento de Química Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.
48. Okutucu B, Dincer A, Habib O, Zihnioglu F. (2007) Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. J Biochem. Biophys. Methods 70, 709-711.

49. Petricoin E, Belluco C, Araujo R, Liotta L. (2006) The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. Nat. Rev. Cancer 6, 961-967.
50. Piñeros M, Pardo C, Otero J, Suárez A, Vizcaíno M, Álvarez V, Trejo R. (2007) Protocolo de vigilancia en salud pública de las leucemias agudas pediátricas. Rev Col Cancerol 11(4), 219-227.
51. Piñeros M, Pardo C, Otero J, Suárez A, Vizcaíno M, Garcia A, Castiblanco C, Trejo R. (2008) Protocolo de vigilancia en salud pública de las leucemias agudas pediátricas.Min. Protección Social, INC, INS-2008
52. Pui CH. (2009) Acute lymphoblastic leukemia: introduction. Semin. Hematol. 46, 1-2.
53. Pui CH, Carroll WL, MeshinchI S, Arceci RJ. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. J. Clin. Oncol. 29, 551-565.
54. Pui CH, Pei D, Campana D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. (2011) Improved prognosis for older adolescents with acute lymphoblastic leukemia; J Clin Oncol.2011 Feb 1;29(4):386-91.
55. Pui CH. (2003) Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research (Current Clinical Oncology.) Edited by Ching-Hon Pui. 562 pp., illustrated. Totowa, N.J., Humana, 2003. ISBN: 0-89603-834-3
56. Putnam FW (1975) Alpha, beta, gamma, omega- the roster of the plasma proteins. Academic Press, New York.
57. Rai A, Gelfand C, Haywood B, warunek D, Yi J, Schuchard M, Mehigh J, Cockrill S, Scott G, Tammen H, Schulz P, Speicher D, Vitzthum F, Haab B, Siest G, Chan D. (2005) HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. Proteomics. 5, 3262-3277.
58. Rengarajan K, De Smet M, Wiggert B. (1996) Removal of albumin from multiple human serum samples. Biotechniques 20, 30-32.
59. Ries L, Smith M, Gurney J, Linet M, Tamra T, Young J, Bunin G. (1999) Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. National Cancer Institute, SEER Program. NIHPub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999., Capitulo 29.
60. Righetti PG. (2013) Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology.
61. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. (2008) The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett. 582, 1783-1787.
62. Rowley J. (1999) The role of chromosome translocations in leukemogenesis. Semin Hematol 1999;36(suppl 7):59–72.
63. Scopes RK. (1994) Protein purification. Principles and practice. 1996. Third edition. Cap 4.
64. Shaw MM, Riederer BM. (2003) Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics. 3, 1408-1417.
65. Shi L, Zhang J, Wu P, Feng K, Li J, Xie Z, Xue P, Cai T, Cui Z, chen X, Hou J, Zhang J, Yang F. (2009) Discovery and identification of potential biomarkers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Proteome. Sci. 7, 7.
66. Smejkal GB. (2004) The Coomassie chronicles: past, present and future perspectives in polyacrylamide gel staining. Expert Rev. Proteomics 1, 381-387.

67. Son WK, Lee DY, Lee SH, Joo WA, Kim CW. (2003) Analysis of proteins expressed in rat plasma exposed to dioxin using 2-dimensional gel electrophoresis. Proteomics 3, 2393-2401.
68. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. (2003) Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. Mol Cell Proteomics. 2003 Apr;2(4):262-70. Epub 2003 May 16.
69. Steen H, Mann M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 699-711.
70. Su F, Kozak KR, Imaizumi S, Gao F, Amneus MW, et al. (2010) Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 16;107(46):19997-20002.
71. Suarez M. (2002) Inmunofenotipaje y supervivencia global de pacientes pediátricos con leucemias agudas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 18.
72. Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. (2011) On the development of plasma protein biomarkers. J Proteome. Res. 10, 5-16.
73. Tainsky M. (2009) Genomic and proteomic biomarkers for cancer: a multitude of opportunities. Biochim. Biophys. Acta 1796, 176-193.
74. Tambor V, Fucíková A, Lenco J, Kacerovský M, Rehácek V, Stulík J, Pudil R. (2010) Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. Physiol Res. 2010;59 (4):471-97. Epub 2009 Nov 20.
75. Tammen H, Schulte I, Hess R, Menzel C, Kellmann M, Mohring T, Schulz-knappe P. (2005) Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. Proteomics. 5, 3414-3422.
76. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. (2003) Characterization of the low molecular weight human serum proteome. Mol. Cell Proteomics. 2, 1096-1103.
77. Vera A, Pardo C, Duarte MC, Suárez A (2012) Análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el Instituto Nacional de Cancerología. Biomédica 32, 355-364.
78. Villaescusa R, Arce A, Linares M, Guerreiro A, Morera L, Espinosa E, Almagro D. Presencia de Inmunocomplejos circulantes y alteraciones del sistema complemento en pacientes con leucemia promielocítica y coagulación intravascular diseminada. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1999; 15(1) : 30-34
79. Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. Electrophoresis 21, 3666-3672.
80. Yu-Chi C, Gudrun P, Tian-Li W, Patrice M, Björn R, Gunnar K, Albert Y, et al. (2005). Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. Cancer research. 2005; 65:331-337.