

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Instituto de Física

Tesis de Maestría

Biomarcadores de Retinoblastoma en lágrimas

Presentado por

Andrés Usiel Rodríguez Rodríguez

Como requisito para la obtención del grado de

Maestro en Ciencias Interdisciplinarias

Directores de tesis

Dra. Vanesa Olivares Illana

Dr. Jesús Hernández Monge

San Luis Potosí, S.L.P, México. Diciembre de 2022



Biomarcadores de retinoblastoma en lágrimas by Andrés Usiel Rodríguez Rodríguez, UASLP is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Agradecimientos...

“Doctores Vanesa Olivares Illana y Jesús Hernández Monge. Sin ustedes y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado. Ustedes formaron parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que los caracterizan. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite; por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían confusas. Gracias por sus orientaciones”.

“A Fefa quien ha sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, quien estuvo siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio. Siempre ha sido mi mejor guía de vida. Hoy cuando concluyo mis estudios, te dedico a ti este logro, como una meta más conquistada. Orgulloso de que estes a mi lado en este momento tan importante. Gracias por ser quien eres y por creer en mí”.

“Mis amigos y docentes, compañeros de viaje, hoy culminan esta maravillosa aventura. Recordare cada experiencia transmitida hacia mi dentro del laboratorio, así como el conocimiento en las aulas impartidas por mis profesores que con gran esmero trataron de guiarnos por el mejor camino hacia el conocimiento”.

Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCION | 7 |
| RETINOBLASTOMA | 7 |
| EPIDEMIOLOGIA | 8 |
| ONCOGENESIS | 8 |
| ESTADIOS DEL RETINOBLASTOMA | 12 |
| DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS | 12 |
| LÁGRIMAS | 14 |
| BIOMARCADORES..... | 14 |
| PROTEÓMICA | 15 |
| PROTEÍNAS Y ENFERMEDAD..... | 16 |
| PROTEÓMICA CLÍNICA..... | 16 |
| SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS SDS-PAGE | 17 |
| DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL..... | 18 |
| ESPECTROMETRÍA DE MASAS..... | 20 |
| ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIN ETIQUETADO | 21 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 23 |
| OBJETIVO ESPECIFICO | 23 |
| JUSTIFICACIÓN | 23 |
| METODOLOGÍA..... | 24 |
| RECOLECCIÓN DE LÁGRIMAS POR MÉTODO DE SCHIRMER | 24 |
| EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS | 26 |
| PRUEBA BRADFORD | 28 |
| SDS-PAGE 1D | 30 |
| TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE | 30 |
| TINCIÓN CON PLATA..... | 32 |
| DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN | 33 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 35 |
| PROTEÍNAS EN LAGRIMAS..... | 35 |
| DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BUFFERS..... | 37 |
| CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LÁGRIMAS BASALES Y REFLEJO..... | 39 |
| EXTRACCIÓN DE LAGRIMA CAMBIANDO TEMPERATURA Y TIEMPO. | 42 |

| | |
|--|----|
| DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS | 43 |
| | 44 |
| EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE INFANTES CON RETINOBLASTOMA Y CONTROLES | 44 |
| PROTEÍNAS EN RETINOBLASTOMA VS CONTROLES | 48 |
| ANÁLISIS DE BANDAS DE RETINOBLASTOMA Y CONTROLES | 49 |
| ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROTEÍNAS | 50 |
| CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DETECTADAS..... | 55 |
| PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE RETINOBLASTOMA EN LAGRIMAS..... | 62 |
| | 64 |
| DISCUSIÓN..... | 64 |
| FIGURAS SUPLEMENTARIAS | 64 |
| CONCLUSIONES | 67 |
| PERSPECTIVAS | 68 |
| SOLUCIONES..... | 69 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 72 |

RESUMEN

El retinoblastoma es un tumor canceroso que se origina en las células de la retina a raíz de la mutación del gen que codifica al supresor de tumores Rb. Esta neoplasia se presenta principalmente en infantes en un rango de edad de 0 a 5 años. Como cualquier otro tipo de cáncer, el retinoblastoma se puede detectar de manera temprana o tardía mediante un diagnóstico clínico donde el médico evalúa los distintos signos que el infante presenta. En la mayoría de los casos los signos se manifiestan con mayor fuerza en estadios tardíos y por ello la única terapia viable es la enucleación de uno o ambos ojos para preservar la vida del infante en primera estancia y después el órgano; desafortunadamente en México la detección es tardía y el principal tratamiento es la enucleación. Por lo tanto, proponemos identificar proteínas características de pacientes con Retinoblastoma (biomarcadores) usando lágrimas como material biológico, para su uso potencial en el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Después de estandarizar un protocolo para la extracción de proteínas en lágrima, se llevó a cabo proteómica libre de marcaje para 2 grupos (pacientes y sanos) con el objetivo de conocer un conjunto de proteínas que muestren un perfil de expresión diferencial en pacientes con retinoblastoma en comparación con infantes sanos.

INTRODUCCION

RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma es el cáncer intraocular más común en infantes a raíz de la mutación bialélica del gen *Rb1* que codifica a la proteína Rb. *Rb1* fue el primer gen supresor de tumores descrito formando parte de la familia de bolsillo, el cual es un dominio que comparte con los miembros p107 y p130 de la misma familia (1,2). La pérdida de un alelo *Rb1* en células de retina predispone al infante al cáncer; la pérdida de ambos alelos permite el desarrollo de tumores malignos o retinoblastoma tanto en forma bilateral o familiar (heredable) así como unilateral o esporádica (no heredable) (figura 1) (2,3). La forma unilateral presenta un tumor en un solo ojo, en cambio, la forma bilateral se presenta en ambos ojos con múltiples tumores (4).

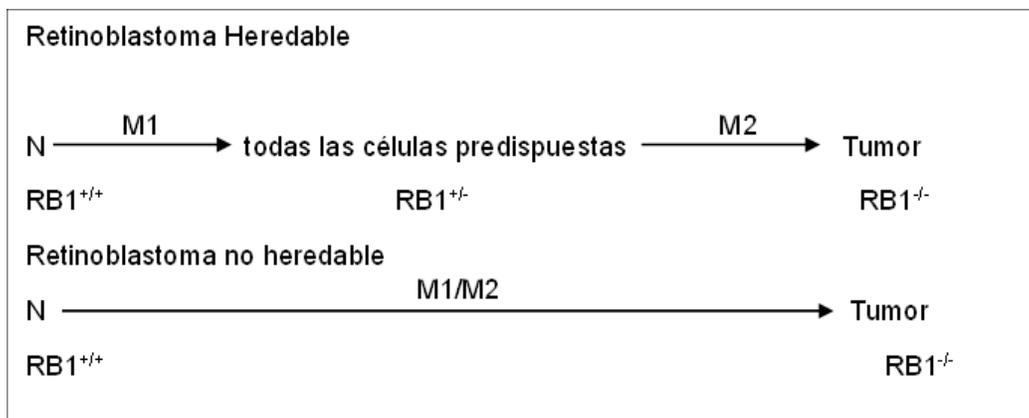


Figura 1.- Genética del retinoblastoma hereditario y no hereditario.

N = normal. RB1 + / + = dos alelos RB1 normales. M1 = mutación constitucional de RB1. RB1 +/- = un alelo RB1 mutado, uno normal. M2 = mutación somática de RB1. RB1 - / - = dos alelos RB1 mutados.

EPIDEMIOLOGIA

La incidencia del retinoblastoma es de 1 caso por cada 15,000 a 20,000 nacimientos vivos y se calculan 9,000 casos nuevos por año alrededor del mundo (5) (6). Esta enfermedad no tiene distinción entre raza o género, pero médicos en países con ingresos bajos reportan más incidencias de esta enfermedad en comparación con médicos en países con ingresos moderados (6). Dentro de los países también existe esta disparidad, por ejemplo, en 2014 un estudio realizado en Argentina reporto la incidencia y supervivencia de retinoblastoma mediante el Registro Onco-pediatrico Hospitalario Argentino (ROHA) y cómo los indicadores socioeconómicos influyen en el resultado (7). Se concluyo que Argentina tiene una incidencia comparable con países desarrollados pero la supervivencia dentro del país varia ya que es 16% menor en provincia con ingresos bajos en comparación con provincias de ingresos mayores, presumiblemente por la detección tardía. En México el factor pobreza genera varianza en la incidencia, por ejemplo, uno de los estados hacia el sur (Chiapas) reporta 21.4 casos de retinoblastoma por millón de niños al año lo cual es 5 veces mayor que en otros estados que reportan una media de 5.4 casos por millón de niños (8).

ONCOGENESIS

El gen *Rb1* fue el primer supresor tumoral descrito en 1980 en el cromosoma 13q14 el cual mide 180 kb y contiene 27 exones que codifican un mRNA (4.7 kb) que traduce una fosfoproteína nuclear (Rb) constituida por 928 aminoácidos y un peso de 110 kDa (1,2,9). En su m n mutaciones clínicas son por la inserción,

delección o sustitución de aminoácidos que caen en los exones 13-21 modificando el dominio de bolsillo (9).

La represión de la transcripción de Rb ocurre por la interacción con BRG (proteínas remodeladoras de la cromatina) y HDACs (histonas desacetilasas) a través del sitio de unión LxCxE impidiendo que la maquinaria de transcripción pueda actuar. Rb regula el ciclo celular dependiendo de su estado de fosforilación. El complejo Rb-E2F se mantiene unido cuando Rb este hipofosforilado, haciendo que E2F no transcriba genes diana para la progresión del ciclo celular, por lo que, cuando las ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDKs) fosforilan a Rb, liberan a E2F para facilitar la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular.

La desfosforilación de Rb ocurre vía p27 (familia kip) inhibiendo a la cinasa dependiente de ciclina involucradas durante la fase G1 temprana. SKP2 reconoce a p27 fosforilada (activa) y la degrada vía ubiquitina-proteasoma para dejar actuar a CDK. Rb ectópico se puede unir a SKP2 a través de su dominio C no estructurado, estabilizando a p27 e inhibiendo a CDK para detener el ciclo celular, formando el complejo Rb-E2F en donde también se recluta HDAC y BRG, causando una alteración en la estructura de la cromatina impidiendo el acceso a la transcripción de Rb conduciendo a la salida del ciclo celular (figura 2) (10). En cambio, cuando Rb es fosforilada, HDAC y BRG son liberados permitiendo la transcripción. Bajo estrés o proliferación celular Rb se encuentra hiperfosforilado, en este estado sufre cambios en su estructura terciaria que implica la liberación de E2F y la conducción hacia apoptosis (figura 2). E2F se conforma por varios miembros, uno de ellos es E2F1 el cual se une a RB e incluso se mantiene así en

la fase G1 tardía, cuando Rb se ha fosforilado y ha liberado a E2F, pero algo de E2F1 se mantiene unido a Rb en esta fase, reclutando a p300/CBP el cual acetila histonas dejando libre al promotor TAp73 para transcribir genes apoptóticos como TP53 (9,10). Entonces, Rb tiene un papel importante en la decisión de conducir a la célula hacia la salida del ciclo celular o apoptosis. Cuando hay mutaciones en el gen *Rb1*, como en retinoblastoma, genera un mal funcionamiento de la proteína Rb para mediar la salida del ciclo celular o la apoptosis conduciendo a un descontrol de la división celular característico del cáncer (figura 2) (9).

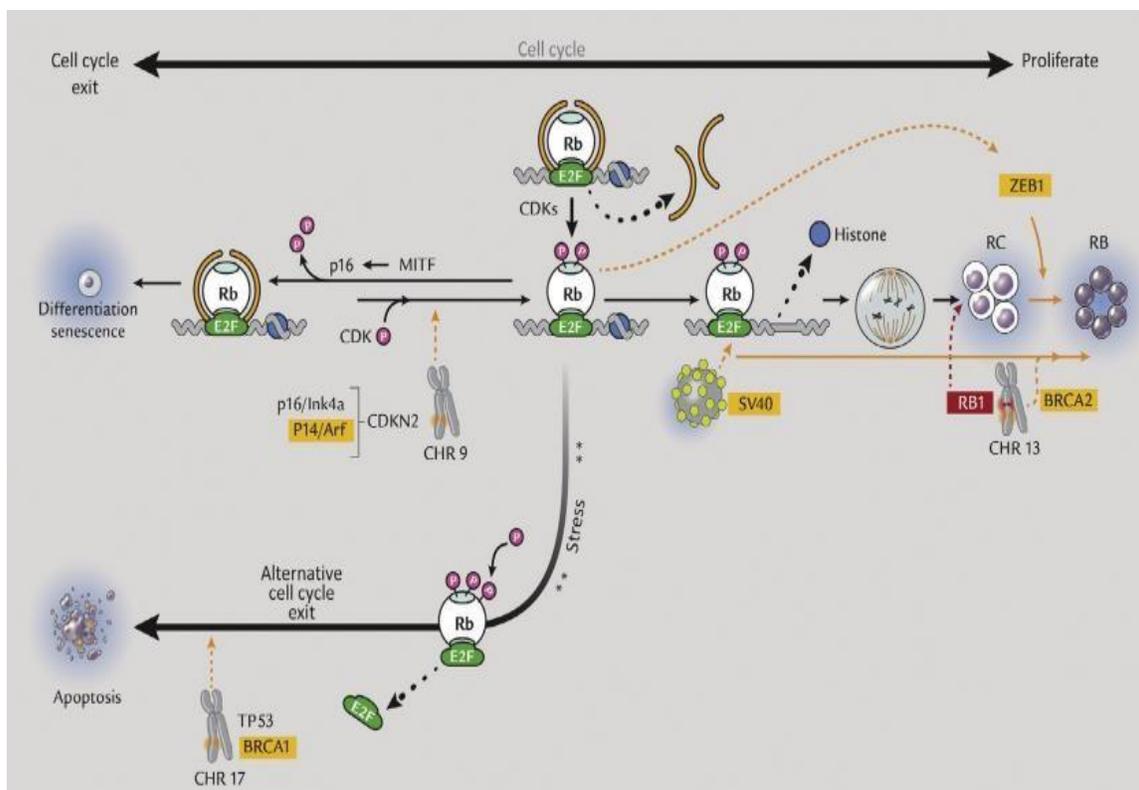


Figura 2.- vías de señalización de Rb.

Para desarrollar retinoblastoma se requieren principalmente 2 eventos mutacionales en ambos alelos del gen *Rb1* para permitir la tumorigénesis (3,6). La transmisión hereditaria se presenta en el 45 % de los casos y su principal característica es la presencia de varios tumores en ambos ojos (bilateral). Los portadores pueden desarrollar tumores en otro tipo de órganos en algún punto de su vida, sin embargo, las células de la retina son más susceptibles a la ausencia del gen *Rb1* (1,2,11). El 55% restante es causado por mutaciones en el gen *Rb1* adquiridas somáticamente, son unilaterales (un tumor en un solo ojo) y no desarrollan predisposición a generar tumores en otros órganos (1,2). Se ha reportado que 3-4% de los casos de retinoblastoma se desarrollaron con una sola mutación en un alelo del gen *Rb1* y el 2% de los casos no mostró mutaciones en el gen *Rb1*, por lo que el mecanismo de tumorigénesis se relacionó con la amplificación focal de *MYCN*, *OTX2* y deleciones en el correpresor *BCL6* (12,13).

La pérdida de Rb a causa de una mutación sensibiliza a las células precursoras de la retina a volverse malignas ya que solo provoca la aparición de retinomas (precursor benigno de retinoblastoma). Existen 2 tipos de retinomas; uno no proliferativo que se ha visto acompañado de una inestabilidad genómica de bajo nivel donde además de la pérdida de Rb se crean copias extras de genes que codifican proteínas como KIF14 (proteína motora) y MDM4 (proteína reguladora de la apoptosis). Por otra parte, el retinoma altamente proliferativo muestra inestabilidad genómica alta generando copias de oncogenes (genes permisivos para proliferación celular) como *DEK*, *E2F3*, *MYCN* y pérdida del gen supresor

tumoral *CDH11*. La ruta que permite a la célula retiniana pasar de ser benigna a maligna aún no se ha descrito totalmente (1).

En cuanto al tratamiento, existen diferentes terapias contra el retinoblastoma que son efectivas dependiendo del estadio en el que es detectado. Por lo general, estos tratamientos son viables cuando se detecta retinoblastoma de manera temprana ya que se busca preservar primeramente la vida del infante y después el órgano.

ESTADIOS DEL RETINOBLASTOMA

El grupo para la Clasificación Internacional de Retinoblastoma Intraocular (IIRC, por sus siglas en inglés) clasifica la gravedad en la que se encuentra el retinoblastoma asignando 5 grupos (A-E). En el grupo A se aprecian tumores menores a 3 mm fuera de la mácula, en el grupo B tumores mayores a 3mm dentro de la mácula, en el grupo C se observan siembras localizadas en el humor vitreo, en el grupo D existen tumores grandes y múltiples siembras y finalmente en el grupo E tumores muy grandes que invaden el ojo causando sangrado y la expulsión del ojo fuera de la cavidad ocular (1).

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS

La identificación del retinoblastoma se da por la observación de distintos signos en un examen clínico, uno de los principales es el reflejo blanco en la pupila (leucocoria). El segundo signo más común es el estrabismo (ojos desalineados). En algunos casos y por falta de atención, el tumor en el ojo puede crecer a tal punto de salir de la cavidad ocular. Muchos de estos signos están relacionados con retinoblastoma, pero también pueden ser signos de otras enfermedades. Una

estrategia es realizar una biopsia, sin embargo, no es recomendable ya que si no se realiza de manera adecuada puede resultar en la promoción de la metástasis (14), por lo que, actualmente la observación simple de los signos en el infante son la forma más eficiente de detectar retinoblastoma; aunque en países desarrollados se puede utilizar resonancia magnética para la detección de la enfermedad, en países en vías de desarrollo no es habitual por el costo elevado de estas técnicas (1).

Cuando se ha diagnosticado retinoblastoma es importante clasificar su estadio para llevar a cabo el tratamiento adecuado. Mediante midriasis (dilatación de la pupila) el médico especialista busca tumores en el fondo de la retina. Una imagen clara en donde se puedan apreciar los tumores que dependiendo de su tamaño y localización respecto a la macula puede respaldar el estadio en que se encuentra. Una vez que se ha identificado el estadio se llevan a cabo tratamientos dependiendo de la gravedad:

- Crioterapia; se utiliza en retinoblastomas pequeños (3mm de diámetro y 2 mm de espesor) repitiendo este tratamiento de 4 a 6 semanas hasta eliminar el tumor.
- Fotocoagulación; es útil en tumores pequeños (2 mm de altura) y situado posterior al ecuador, por lo general es oportuna en los estadios A, B y C. Además, este tratamiento también es de gran ayuda contra recurrencias de otros tratamientos, o sea si se utiliza la enucleación es conveniente usar fotocoagulación para estar seguros de la eliminación del tumor (Diagnóstico y Manejo del Retinoblastoma. México: Secretaria de Salud, 2013).

Existen otros tratamientos para combatir el retinoblastoma, sin embargo, todos son viables cuando la enfermedad es detectada de manera temprana. En la mayoría de los casos y sobre todo en países en vías de desarrollo la detección es tardía, por lo que, el único tratamiento es la enucleación para así preservar la vida anteponiendo el valor social de los órganos oculares.

LÁGRIMAS

Las lágrimas son un fluido corporal que cubren la superficie del ojo. Dentro de sus funciones sirven como lubricante, previenen la deshidratación del líquido superficial ocular, protección contra varios patógenos y nutre a células subyacentes. Se compone de 3 capas: la capa externa compuesta de lípidos que evitan la evaporación del líquido; la capa intermedia o acuosa donde se encuentra la mayoría del líquido; la capa interna compuesta de proteínas como la mucina. En general las lágrimas son un fluido corporal complejo que contiene proteínas/péptidos, electrolitos, lípidos, metabolitos, carbohidratos y bacterias principalmente (15). Por lo que, nos interesa la parte proteica y basado en la literatura existen distintos protocolos para extraer estas biomoléculas a partir de lágrimas (15–17).

BIOMARCADORES

Según el Instituto Nacional de Cáncer un biomarcador es “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, u otros fluidos corporales o tejidos y son un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad”. Los

biomarcadores permiten diferenciar a una persona enferma de una sana y hay una gran variedad de estas moléculas: proteínas, ácidos nucleicos, etc. Los biomarcadores pueden obtenerse de manera invasiva mediante biopsias o de forma no invasiva a través de la circulación (sangre, suero o plasma) y excreciones (heces, orina, esputo o secreción del pezón). Los biomarcadores tienen múltiples enfoques dentro del cáncer como la detección de tumores primarios, distinción de tumores malignos de benignos, diferenciación entre diferentes cánceres, evaluación de algún medicamento o monitorear el estado de salud de un paciente, entre otros. También se han identificado biomarcadores para evaluar el riesgo de una persona para padecer cáncer (18). Por ejemplo, de acuerdo con el historial familiar de cáncer de ovario, una mujer puede realizarse pruebas genéticas de tal manera que se pueda conocer si porta una mutación en línea germinal, como BRCA1, aumentando su riesgo de padecer cáncer de ovario. De esta manera, la mujer podría tener al alcance más opciones para combatir dicha enfermedad ya que se está detectando antes de que la enfermedad empeore o madure (16).

PROTEÓMICA

Marc Wilkins utilizó por primera vez el término proteoma (PROTEína + genOMA) con el cual describe el complemento proteínico (conjunto de proteínas que una célula u organismo puede expresar) correspondientes al de un genoma (20). La proteómica se refiere al estudio del proteoma, es decir, las proteínas en una célula, organismo o medio biológico presente en un momento determinado. El proteoma no es estático como lo es el genoma, sino dinámico, ya que nos da una idea más realista de algún proceso biológico pues refleja el programa genético

intrínseco, así como el impacto de su entorno. Por esa razón se espera sea más útil que un análisis genético para valorar, por ejemplo, la presencia de una enfermedad, su progresión y su respuesta al tratamiento (21,22)

PROTEÍNAS Y ENFERMEDAD

Las proteínas son unas de las principales biomoléculas de las células que participan en muchas funciones. Estas pueden modificarse al expresarse de acuerdo con el momento del ciclo celular, la diferenciación, la función de la célula, como respuesta ante una agresión o estrés. Entonces, la expresión de los genes dependiendo del contexto celular puede aumentar o disminuir la concentración de proteínas y, por lo tanto, esta información se puede utilizar para evaluar el estado de la célula. La proteómica busca identificar estos cambios que afectan a la célula. En respuesta a un tipo de estrés, ocurren modificaciones postraduccionales en las proteínas, modificando la vía de señalización donde están implicadas. Las enfermedades, pueden actuar como estrés celular logrando modificar la expresión de distintos genes y como consecuencia, variaciones en la concentración de proteínas (21)

PROTEÓMICA CLÍNICA.

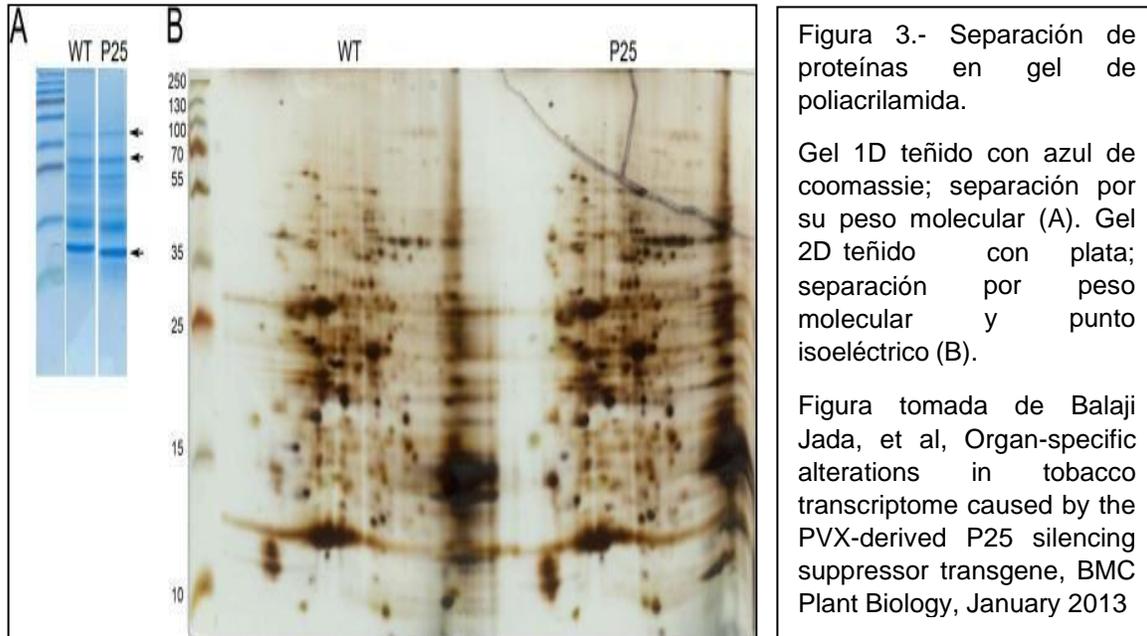
Se define como la aplicación de las técnicas y estrategias de la proteómica en el área de la medicina enfocado principalmente en el diagnóstico y descubrimiento de biomarcadores. Se sabe que la identificación de una sola proteína (biomarcador) no es suficiente para poder diferenciar una enfermedad de

otra, sino, es necesario un patrón específico (huella molecular) de biomarcadores que puedan determinar con mayor precisión una enfermedad (23).

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS SDS-PAGE

El SDS-PAGE es una técnica útil para observar el panorama de proteínas contenidas en una muestra biológica. Para llevar a cabo la separación de proteínas son necesarios 2 elementos: primero el gel de poliacrilamida el cual se hace con base a un protocolo ya establecido y dependiendo del porcentaje de concentración requerido para nuestro interés. Lo segundo es extraer proteínas a partir de una muestra biológica mediante protocolos. Posteriormente, se realiza una electroforesis en una dimensión (1D) o dos dimensiones (2D). En 1D las proteínas se separan por su peso molecular y en 2D por su peso molecular y punto isoeléctrico.

Después de separar las muestras en gel de poliacrilamida 1D o 2D, las proteínas se fijan y tiñen con una tinción compatible con la espectrometría de masas que por lo general es azul de coomassie, o plata sin usar glutaraldehído (figura 3) (24).



DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL

Las proteínas visibles en bandas (1D) o manchas/puntos (2D) son escindidas (1 mm x 1 mm) del gel para a continuación ser decoloradas por lavados y deshidratadas mediante acetonitrilo antes de ser tratadas con tripsina (digestión) para posteriormente someter las muestras a espectrometría de masas (Figura 4) (24,25).

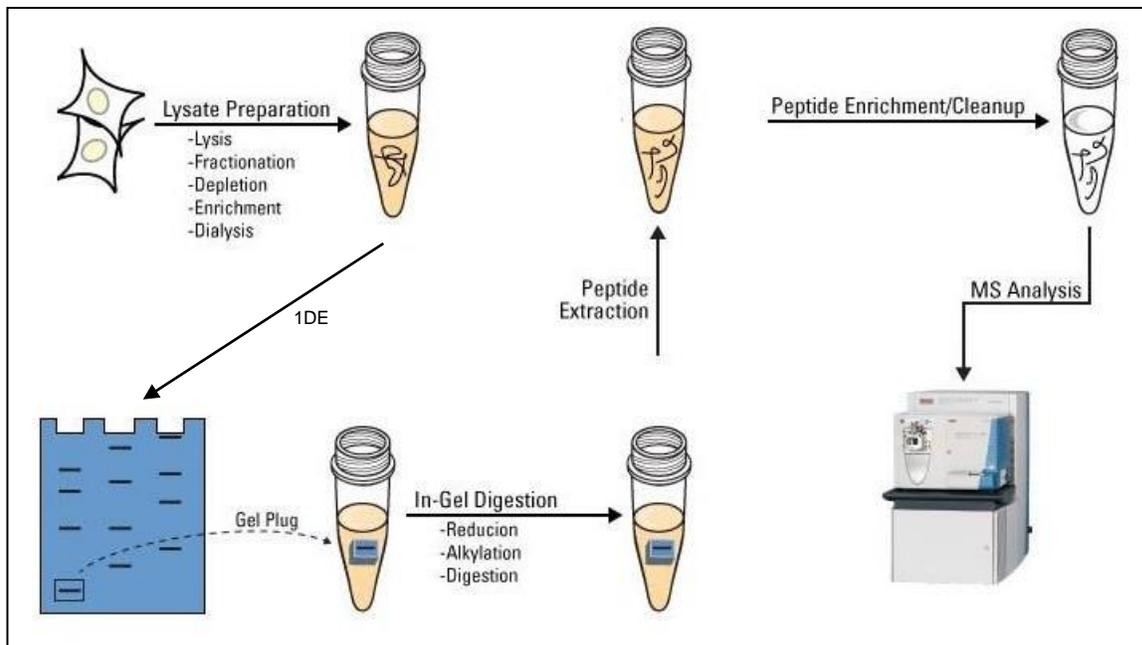


Figura 4.- Digestión en gel 1D.

La deshidratación ayuda a que la enzima (tripsina) penetre dentro del gel. La enzima está contenida en una solución tampón la cual va a hinchar el trozo de gel por difusión, por lo que, al cortar el trozo de gel lo más pequeño posible la eficiencia de la digestión aumenta. Adicionalmente, se pueden agregar tensioactivos (detergentes) ya que ayudan a solubilizar y desnaturalizar a las proteínas en el gel aumentando la sensibilidad de extracción, especialmente para proteínas lipófilas (proteínas de la membrana). Se puede agregar ácido fórmico (5%) junto con un paso de sonicación para una mejor extracción. Una ventaja de la digestión en gel es que los contaminantes como detergentes y sales se eliminan durante la electroforesis, por lo que, las muestras pueden someterse fácilmente al análisis por espectrometría de masas. Desafortunadamente, esta técnica debe ser manipulada en muchas ocasiones permitiendo la contaminación principalmente por queratina

por lo que se ha desarrollado un protocolo (HiT-Gel) que evita esto ya que el procedimiento se lleva a cabo en cámaras de vacío y con multipipetas para evitar la continua manipulación directa de la muestra además de generar un 5% mayor eficiencia en la identificación de proteínas (24,26).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas presentes en el perfil global en un momento dado dentro de una muestra se pueden observar mediante la separación de proteínas en un gel de poliacrilamida de 1D o 2D ; el gel 2D nos muestra un panorama más extenso en cuanto al perfil proteico ya que separa primero por su peso molecular y después por su punto isoeléctrico. Dentro del gel 2D existe una variante (2D-DIGE) en la cual se marcan con fluoroforos las distintas muestras para poder comparar dos variables en un mismo gel y así reducir la variabilidad que ocurre al comparar dos geles de manera independiente (27,28). En la proteómica además del perfil proteico también es necesario conocer el nivel de expresión, por lo que, a partir de la separación de proteínas (1D o 2D) se pueden cuantificar las diferencias mediante la digestión de proteínas en gel (29). Sin embargo, las manchas presentes en un gel 2D en ocasiones son demasiado grandes sugiriendo la presencia de más de una proteína volviéndose difícil de analizar, así como puntos isoeléctricos extremos ya que, la proteína se moverá hasta que su punto isoeléctrico concuerde con el pH; una proteína con un punto isoeléctrico de 12 se detendrá en un pH de 12 pero si la proteína posee un punto isoeléctrico de 15 entonces saldrá de la escala de acidez. Actualmente se han desarrollado nuevas tecnologías que permiten la identificación y cuantificación de proteínas sin la necesidad de hacer un gel de poliacrilamida

como técnicas proteómicas libres de gel. Algunas de ellas son MudPIT, ICAT, ICPL, iTRAQ, etc. En el caso de iTRAQ, se conforman por 3 grupos: reportero, equilibrio y reactivo; en el grupo reactivo están los grupos químicos que varían su masa atómica disminuyendo en 1 Da pero junto al grupo equilibrio se introduce un isótopo de oxígeno que mantiene la masa total (isobárico) y el reportero es el grupo químico que forma el enlace entre la etiqueta y la proteína. Si son 4 etiquetas tienen un peso de 114.1 Da hasta 117.1 Da y si son 8 etiquetas tienen un peso desde 113.1 Da hasta 121.1 Da. Entre estas etiquetas se mantiene la masa al involucrar un isótopo pero el isótopo es distinto para cada condición y de esta manera nos permite observar y comparar la expresión de una misma proteína en distintas condiciones (retinoblastoma y controles) (28,30) Estas técnicas también tienen sus limitantes como mayor tiempo y complejidad en la preparación de la muestra, se requiere mayor concentración de muestra, alto costo de los reactivos, etiquetado incompleto y software de cuantificación específico. Por lo tanto, se han desarrollado técnicas donde además de no ser necesario el gel de poliacrilamida tampoco se necesita un etiquetado (28,31)

ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIN ETIQUETADO

Cualquier técnica cuantitativa sin etiquetas incluye en su protocolo: preparación de la muestra, incluyendo la extracción, reducción, alquilación y digestión de proteínas; separación de muestras por cromatografía líquida en fase reversa; análisis por MS/MS; análisis de datos, incluida la identificación, cuantificación y análisis estadístico de péptidos/proteínas. La diferencia entre la espectrometría de masas con o sin etiquetado radica en su preparación, en el caso

del uso de un etiquetado la muestra es marcada y posteriormente se mezcla para después ser analizada (figura 4^a) mientras que cuando no se usa un etiquetado, la muestra es analizada por separado (figura 4b). En ambos casos existen 2 categorías de medición: el primero mide los cambios de intensidad de iones mediante la intensidad de los picos para péptidos; el segundo se basa en el conteo espectral de proteínas. Para identificar los cambios en la abundancia de proteínas se calcula mediante una comparación directa entre diferentes análisis (28).

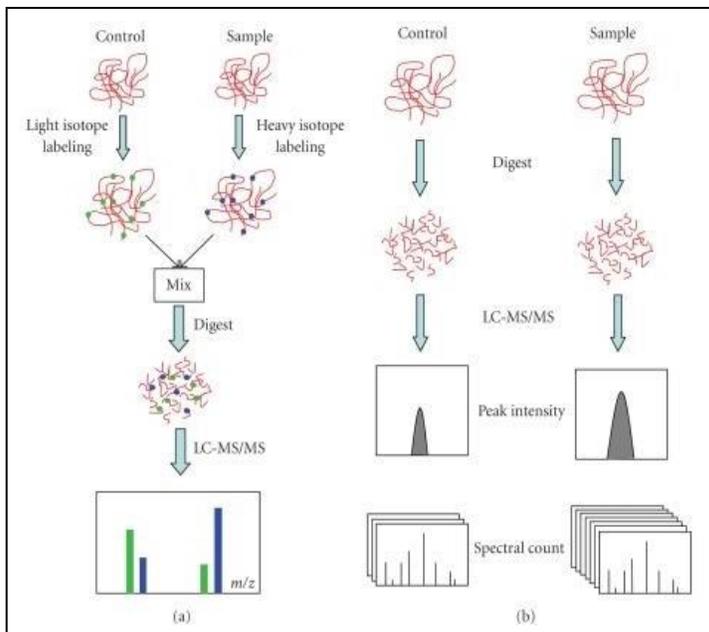


Figura 4.- Proteómica cuantitativa. (a) Con etiquetado; después de marcar con isotopos tanto las muestras como los controles se analiza mediante LC-MS/MS. (b) Sin etiquetado; control y muestra son analizados por separado y se compara la señal de la intensidad del pico (péptidos) o el conteo espectral (proteínas) tanto en control como muestra de interés.

Figura tomada de Wenhong Zhu, et al, Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics, J Biomed Biotechnol, 2009 Nov 10.

OBJETIVO GENERAL

- Obtener una huella molecular para la identificación de pacientes con retinoblastoma en lágrimas.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Estandarizar un método para la recolección de lágrimas.
- Estandarizar un protocolo enfocado en niños para la extracción de proteínas en lágrimas.
- Validación por *western blot* de los potenciales marcadores derivados del análisis proteómico por espectrometría de masas.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el diagnóstico del retinoblastoma es exclusivamente clínico y en la mayoría de los casos tardío. No existen marcadores moleculares que permitan un diagnóstico temprano para retinoblastoma, por lo que es necesario implementar un panel de marcadores que auxilien en el diagnóstico oportuno de esta patología.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE LÁGRIMAS POR MÉTODO DE SCHIRMER

La prueba de Schirmer se creó inicialmente con la finalidad de identificar pacientes con el síndrome de ojo seco. Si la producción de lágrimas, evaluada por la absorción con la tira, tenía un llenado <5 mm en 10 minutos entonces, es un indicativo de ojo seco (32). Aprovechando el procedimiento podemos obtener material biológico, es decir, las lágrimas. Una vez que las lágrimas están contenidas en la tira absorbente son congeladas a -80°C para su posterior procesamiento donde se extraen las proteínas y su posterior análisis (17). Cabe resaltar que la finalidad de este trabajo no es la identificación de ojo seco por lo que, estandarizamos un volumen de 15 – 20 mm en tira como mínimo para obtener una buena concentración de proteínas. También buscando en la literatura nos percatamos de la existencia de 2 tipos de lágrimas: basal y reflejo (16). La diferencia entre ambas es que las basales contienen mayor concentración de proteínas en comparación con las de reflejo que en su mayoría es agua (33). También se sabe que provienen de estructuras distintas, en el caso de las lágrimas basales son secretadas por glándulas lagrimales accesorias y para las lágrimas de reflejo son secretadas por glándulas lagrimales al activarse los nervios de la córnea ante un estímulo de irritación (15). A partir de este hecho se decidió solo utilizar solo una tira por cada extracción de lagrima ya que al colocar una segunda tira en el mismo ojo promovíamos la excreción de lágrimas de reflejo generando ruido al momento de estandarizar la extracción de lágrimas.

El método Schirmer se realizó de la siguiente manera basado en Community Eye Health Journal (34).

Antes de realizar cualquier procedimiento ocular:

- Lavarse las manos, usar guantes estériles y usar bata.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos con alcohol al 70%.
- Acomodar al paciente en un lugar cómodo con buena iluminación y explicarle el procedimiento.

Materiales:

- Paquete de tiras Schirmer.
- Tubo falcón de 15 ml.
- Hielo.

Método:

1. Retirar las tiras absorbentes del paquete.
2. Doble la tira, en la muesca, en un ángulo de 90°.
3. Pida al paciente que dirija su vista hacia arriba para colocar la tira sobre el párpado inferior y a continuación que cierre el ojo.
4. Después de un llenado de 15-20 mm retire la tira y colóquela en el tubo falcón de 15 ml y rotule.
5. Si es necesario reserve en hielo o guárdela directamente a -80°C.
6. Repita el procedimiento para el otro ojo.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Las muestras de lágrimas recolectadas en las tiras contienen además de proteínas muchas otras sustancias que no son de nuestro interés como lípidos, carbohidratos, sales, entre otras (15). A continuación, se muestra el protocolo utilizado para extraer las proteínas. Cabe mencionar que probamos distintos protocolos, combinándolos de tal manera que obtuviéramos la mayor concentración de proteínas al momento de cuantificar.

Antes de realizar la extracción de proteínas

- Usar guantes estériles, bata y cubrebocas.
- Limpiar con alcohol al 70% el área de trabajo.
- Esterilizar con alcohol al 70% los instrumentos.

Materiales

- Pinzas de metal largas.
- Tijeras.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Bicarbonato de Amonio (BiCAM) + Urea 8M
- Inhibidores de proteasas.
- Acetona de grado molecular (frio a -20°C).
- TEAB-Urea 8M.

Método:

1. El falcón de 15 ml que contiene la tira se saca del ultra congelador (-80°C).
2. Con el uso de las pinzas se toma la tira, con cuidado se corta en pequeños trozos (5 mm cada trozo) y se colocan en un tubo eppendorf rotulado.
3. Se agrega 100 µL de BiCAM +Urea 8M + 6 µL de inhibidores de proteasas.
4. Se da un *vórtex* por aproximadamente 20 segundos.
5. Se ponen en la microcentrífuga por 60 segundos.
6. Se incuba a temperatura ambiente por 1 hora sobre una gradilla.
7. Se recupera el líquido con cuidado y se coloca en un nuevo eppendorf rotulado.
8. Se agrega 6 volúmenes de acetona (600 µL) y se deja a -20°C hasta el día siguiente.
9. Se da un *vórtex* por aproximadamente 20 segundos.
10. Se enfría la centrifuga a 4°C y se programa de la siguiente manera: 12,000 rpm, 4°C y 18 minutos.
11. Se colocan las muestras manteniendo un equilibrio de peso dentro de la centrifuga.
12. Se decanta el líquido y se agregan 600 µL de acetona.
13. Se da un *vortex* por aproximadamente 20 segundos.
14. Se vuelve a colocar en la centrifuga programada de la siguiente manera: 12,000 rpm, 4°C y 15 minutos.
15. Se decanta el líquido y se deja evaporar el sobrante durante aproximadamente 5 minutos.

16. Se resuspende la muestra con 20 μL de TEAB-Urea 8M + 1.5 μL de inhibidores de proteasas.

17. Se guardan las proteínas obtenidas a -20°C para su posterior cuantificación y análisis por espectrometría de masas.

PRUEBA BRADFORD

El ensayo de proteína azul brillante de Coomassie o prueba de Bradford nos permite medir la concentración de proteínas en microgramos en una absorbancia de 590 nm. Es un ensayo rápido, sencillo y sensible. Cuando hay un alto grado de concentración de proteínas se presenta una curvatura, por lo cual, se usan concentraciones altas para calibrar (BSA) de 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hasta 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en intervalos de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para luego ajustar por regresión lineal (figura 5). Recordemos que si la concentración de la muestra es mayor a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se debe diluir para evitar errores (35).

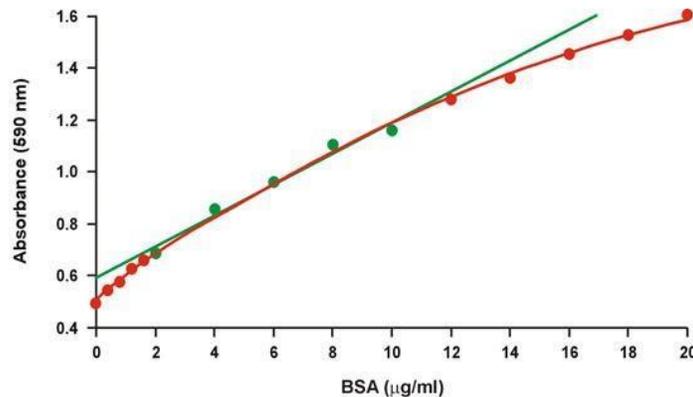


Figura 5.- Grafico de calibración de Bradford. El rango lineal (BSA) se representa en verde. La curvatura presente en muestras se representa en rojo. Después se ajusta mediante regresión lineal con una $R > 0.99$.

Figura tomada de: Ernst, O., Zor, T. Linearization of the Bradford Protein Assay. J. Vis. Exp. (38), e1918

Materiales:

- Reactivo Bradford.
- Muestras.
- Cubeta de cristal.
- Espectrofotómetro.

Método:

Previo a medir las muestras se calibra con albumina ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se alícuota 6 tubos eppendorf de $0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ hasta $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en intervalos de $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. De igual manera se agregan $2 \mu\text{L}$ de muestra que contienen las proteínas de la lagrime. Después a cada eppendorf agregar $1000 \mu\text{L}$ de reactivo Bradford dejando a temperatura ambiente por 5 minutos para dejar estabilizar la coloración.

1. Se inicia agregando el contenido del primer eppendorf que contiene la albumina ($0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) a la cubeta de cristal, posicionándola y eligiendo la opción de "*blank*" en el espectrofotómetro.
2. Después se elige la opción "*standard*" para medir.
3. Se leen los demás eppendorf que contienen la albumina a 595 nm . El valor aceptable del coeficiente de correlación ("*R*") de la curva es de 0.99 y no menor.
4. Después se selecciona la opción "*sample*".
5. Se leen todas las muestras a 595 nm .

SDS-PAGE 1D

Como se mencionó anteriormente, el SDS-PAGE de una dimensión nos permite separar proteínas en un gel de poliacrilamida al llevar a cabo una electroforesis. Su principio se basa en que el gel presenta un cierto grado de porosidad (% de acrilamida) por donde pueden difundir proteínas de cierto tamaño, donde las más grandes se quedarán atrapadas en la parte superior mientras que las más pequeñas o de menor peso molecular difundirán hacia el fondo. El movimiento de las proteínas es impulsado por un campo eléctrico generado por la cámara de electroforesis donde en la parte superior del gel tiene una carga negativa mientras que en la parte inferior hay una carga positiva. Las muestras son tratadas con SDS para que contengan una carga negativa antes de correr el gel y de esa manera migren hacia el polo positivo en función de su peso molecular, además de buffer de proteína para su visualización. Finalmente, se tiñe con un colorante para visualizar el panorama de proteínas en nuestra muestra.

TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Materiales:

- Gel de poliacrilamida (% depende del experimento).
- Cámara de electroforesis.
- Marcador de peso molecular.
- Muestras cuantificadas.
- Buffer de corrida.
- Buffer de proteínas.

- Azul de coomassie.

Método

1. El gel de poliacrilamida se hace en base a protocolo y el porcentaje depende del experimento.
2. Una vez obtenido el gel se coloca en la cámara de electroforesis.
3. Se llena hasta donde indique la cámara con buffer de corrida.
4. Se coloca el marcador de peso molecular (3 μ L) dentro de un carril al extremo del gel.
5. Se colocan las muestras en los carriles siguientes calculando el volumen en base a la cuantificación obtenida mediante Bradford.
6. Se cierra la cámara de electroforesis manteniendo con cuidado la carga de la tapa con la cámara.
7. Se corre a 90 mV por aproximadamente 1 hora 45 minutos o hasta que la línea azul presente en el gel y visible para el espectador se encuentre en la frontera inferior del gel.
8. Se reserva el buffer de corrida y el gel se coloca en un recipiente en donde se le agregara azul de coomassie hasta cubrir por completo el gel dejándolo 10 minutos aproximadamente.
9. Se recolecta el azul de coomassie y se agrega agua desionizada hasta el día siguiente para una mejor tinción.

TINCIÓN CON PLATA

Una variante para hacer gel en 1D es usar a la plata como tinción. A diferencia del coomassie que puede identificar bandas de hasta 50 ng, la plata es 50 veces más sensible al detectar señal de proteínas incluso hasta péptidos (36).

Materiales:

- Solución fijadora.
- Etanol al 30%.
- Agua destilada.
- Solución sensibilizadora.
- Solución de tinción.
- Solución reveladora.

Método:

Previo a la tinción con plata se lleva a cabo la electroforesis con soluciones nuevas y material limpio para después teñirse con plata.

1. Se agrega solución fijadora en el gel y se incuba durante toda la noche (*overnight*).
2. Se lava el gel con etanol 30 % por 10 minutos repitiéndolo 3 veces.
3. Se lava el gel con agua destilada por 10 minutos repitiéndolo 2 veces.
4. Se incuba el gel con solución sensibilizadora por 1 minuto.
5. Se lava el gel con agua destilada por 1 minuto repitiéndolo 2 veces.
6. Se incuba el gel con solución de tinción por 25 minutos.
7. Se lava el gel con agua destilada durante 1 minuto.

8. Se agrega solución reveladora durante 2-3 minutos o hasta apreciar bandeo.
9. Se detiene la reacción con solución fijadora; de lo contrario el gel se torna oscuro.

DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN

Como se describió en “espectrometría de masas sin etiquetado”, previo a dicha técnica es necesario llevar a cabo una digestión de proteínas en solución. Por lo que, una vez obtenidas las proteínas a partir de la muestra biológica procedemos a realizar el siguiente paso antes del análisis proteómico, es decir la digestión, reducción y alquilación.

Reducción

- A partir de una cuantificación de proteínas contenidas en nuestra muestra, colocamos 10µg en un microtubo y aforamos hasta 20 µL con TEAB-Urea 8M.
- Se agregan 2 µl de DTT 50 mM si el volumen de muestra es menor a 40 µL (si es mayor a 40 µL se agregan 4 µL).
- Se colocan en agitador por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Después se recubre con aluminio los eppendorf y se vuelve a colocar en agitador por 30 minutos adicionales a temperatura ambiente.

Alquilación

- Se agrega 1 µL de IAA 200 mM si el volumen es menor a 40 µL (si es mayor a 40 µL se agregan 2 µL) y se coloca nuevamente en agitador durante 10 minutos protegido de la luz (cubierto con aluminio).

- Se agrega el volumen necesario de TEAB 50 mM para diluir la muestra 10 veces previo a la digestión.

Digestión con tripsina

- Se agrega la tripsina en una relación de 1:20. Esta cantidad de tripsina se agregará en 2 tiempos; la primera mitad de tripsina se agrega a las muestras, se da 1 minuto de *vórtex*, spin y se incuba por 1 hora a 37 °C.
- Se sacan y agrega la mitad restante de tripsina.
- Se da spin y *vórtex* por 1 minuto.
- Se incuba durante 20-24 horas a 37 °C.
- Al día siguiente se cargan las muestras en un gel de poliacrilamida para corroborar que se hayan digerido las proteínas. Adicionalmente si se obtienen un volumen final muy grande de tal manera que sobrepase el volumen de los pozos en el gel se hace un *speed vac* para reducir el volumen de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTEÍNAS EN LAGRIMAS

Inicialmente quisimos observar la expresión de proteínas en lágrimas mediante un gel 1D comparándolo con el que la literatura nos ofrece (figura 6 a y b). Obtuvimos un mejor bandeo en comparación con el reportado en la literatura (37). Cabe resaltar que la extracción de lágrimas mediante tiras de Schirmer es mejor en comparación con el método de capilaridad (6 b).

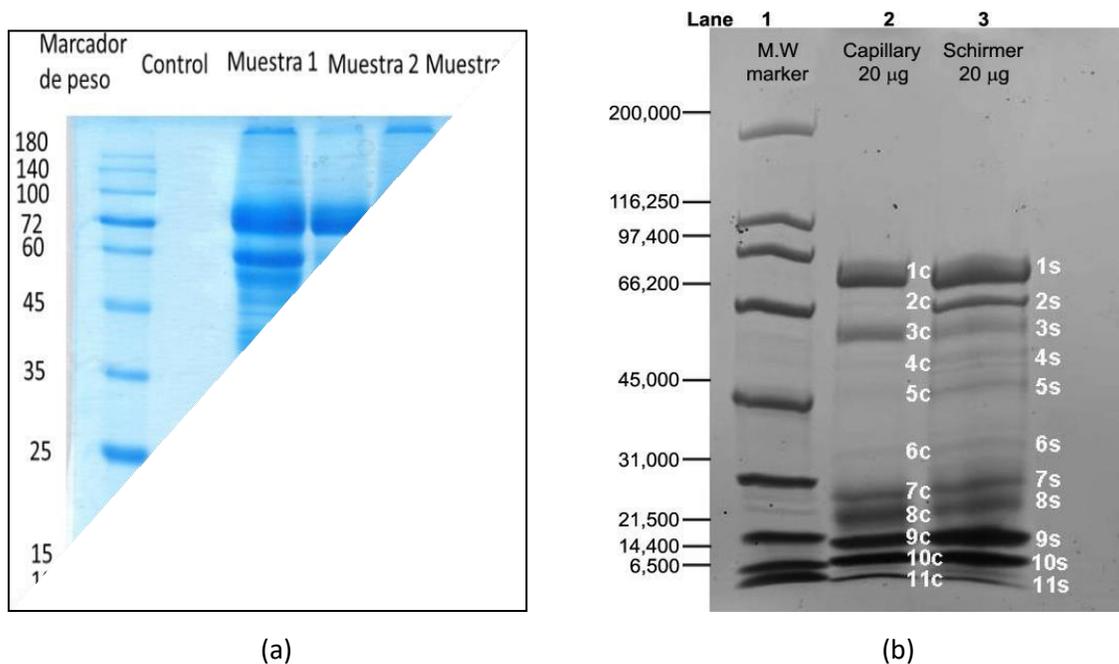


Figura 6.- SDS-PAGE 1D de proteínas en lágrimas.

Proteínas contenidas en lágrimas de 3 individuos distintos teñidas con azul de coomassie (a). Proteínas contenidas en lágrimas encontradas en la literatura (b).

Imagen (b) extraída de Green-Church, K.B., et al 2008.

Posteriormente, utilizando un protocolo enfocado en la extracción de lágrimas en adultos (32,38) se estandarizo la extracción de las proteínas en la muestra biológica por lo que, nos basamos en un trabajo previo con el cual obtuvimos una mejor cantidad de proteínas. En este trabajo se utilizaron distintos buffers de extracción como bicarbonato de amonio con urea 8M (BiCam+Urea 8M), RIPA, bicarbonato de amonio (BiCam). Finalmente, se decidió utilizar BiCam + UREA 8M ya que en base a experimentos pudimos observar un mejor panorama en cuanto a proteínas contenidas en lágrimas (Figura 7). Se observo mayor bandeo en carriles 1 y 2 pero, al ser el RIPA un buffer con mayor cantidad de detergentes (posiblemente interfiera en espectrometría de masas) se descartó como opción viable.

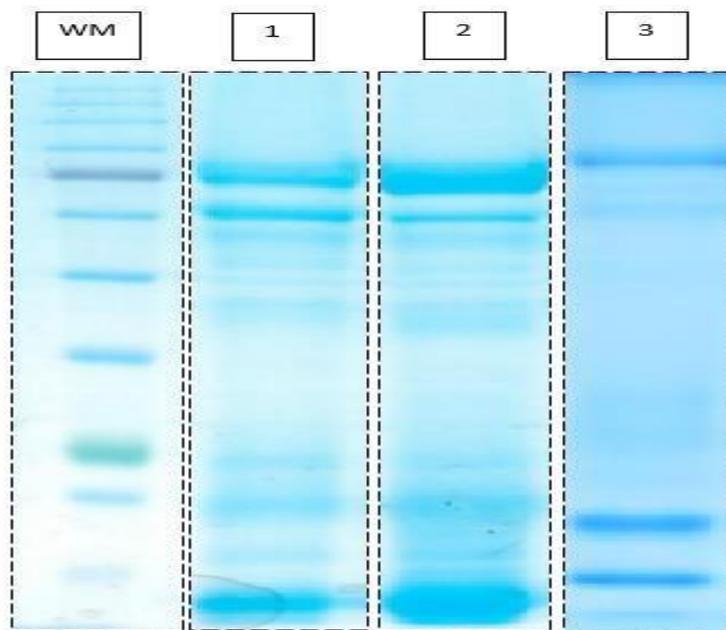


Figura 7.- SDS-PAGE 1D de proteínas en lagrima utilizando distintos buffers de extracción. BiCam + UREA 8M (carril 1); RIPA (carril 2) y BiCam (carril 3).

Después, se decidió seguir agregando distintas variables durante la extracción de proteínas ya que al ser nuestro material biológico limitado en el caso de pacientes con retinoblastoma necesitamos optimizar la máxima cantidad de proteínas ya que previo a la espectrometría de masas se hacen experimentos tales como, digestión de proteínas en solución y en gel. Entonces, con base en distintos artículos buscados en pubmed bajo las palabras clave *extraction*, *proteomics*, *tear* y *Schirmer's test* se obtuvieron distintos protocolos en donde se diferencian cada uno de ellos en algún paso dentro de su metodología desde la toma de muestra hasta como el tiempo de reposo tanto en hielo o en temperatura ambiente, así como el volumen de buffer entre otras.

DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BUFFERS

Se recolectaron lágrimas de 6 adolescentes usando el mismo protocolo anteriormente descrito y se extrajeron sus proteínas, pero modificando la concentración del BiCam + Urea 8M, así como el uso de agua como buffer de extracción. Como se observa (tabla 1) el uso del doble de concentración de BiCam + Urea 8M (200 μ L) no permite obtener mayor concentración de proteínas en comparación con el uso de 100 μ L de BiCam + Urea 8M. Asimismo el uso de agua estéril como buffer de extracción muestra un resultado similar, por lo que, usar 100 μ L de BiCam + Urea 8M es la mejor opción.

Tabla 1.- distintas concentraciones de BiCam y uso de agua como buffer de extracción

| Protocolo | Masculino | Masculino | Femenino | Masculino | Femenino | Femenino |
|----------------------------|--|--|--|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 16 años | 16 años | 17 años | 17 años | 15 años | 15 años |
| Obtención de muestra | 25 mm de volumen en tira Schirmer | 25 mm de volumen en tira Schirmer | 25 mm de volumen en tira Schirmer |
| Extracción de lagrima | 200 uL de BiCam + [Urea 8M] + complete | 200 uL de BiCam + [Urea 8M] + complete | 100 uL de BiCam + [Urea 8M] + complete | 100 uL de BiCam + [Urea 8M] + complete | 100 uL de H2O esteril + complete | 100 uL de H2O esteril + complete |
| Precipitación de proteínas | 6 volúmenes de acetona (1200 uL) | 6 volúmenes de acetona (1200 uL) | 6 volúmenes de acetona | 6 volúmenes de acetona | 6 volúmenes de acetona | 6 volúmenes de acetona |
| Resuspensión de la muestra | 20 uL TEAB-Urea 8M + complete | 20 uL TEAB-Urea 8M + complete | 20 uL TEAB-Urea 8M + complete |
| Cuantificación | 2.55 ug/uL | 1.57 ug/uL | 9.59 ug/uL | 3.35 ug/uL | 5.35 ug/uL | 3.62 ug/uL |
| Gel 1D al 12% | 15 ug | 15 ug | 15 ug | 15 ug | 15 ug | 15 ug |

Posterior a la cuantificación se comprobó que el uso de 100 uL de BiCam + Urea 8M también es mejor en cuanto al panorama de proteínas en un gel SDS-PAGE 1D (figura 8). Como se observa usando 100 µL de BiCam + Urea 8M nos muestra un bandeo más variado y con mayor intensidad en comparación con el doble de volumen de buffer, así como el uso de agua estéril.

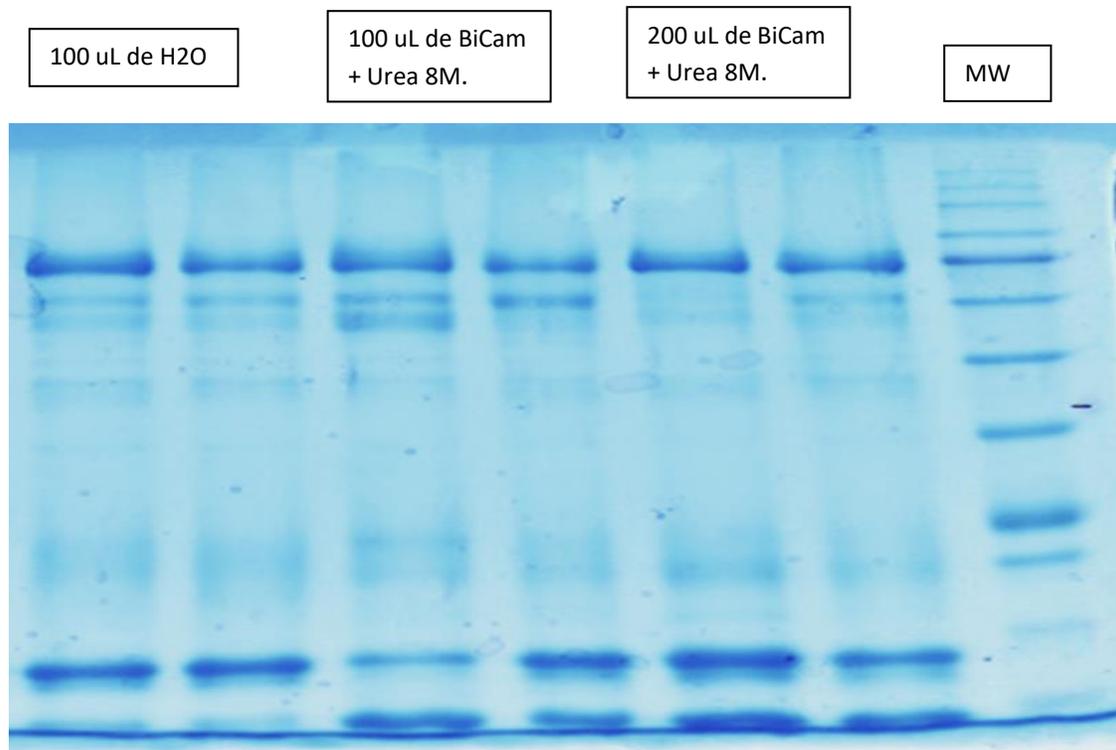


Figura 8.- SDS-PAGE 1D de distintas concentraciones de BiCam y uso de agua como buffer de extracción.

De izquierda a derecha: los dos primeros carriles corresponden a 100 μ L de H2O; carril 3 y 4 se utilizó 100 μ L de BiCam + Urea 8M y en carril 5 y 6 se usó el doble de concentración.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LÁGRIMAS BASALES Y REFLEJO.

Siguiendo la línea de investigación para optimizar la obtención de proteínas se encontró en la literatura que existen distintos tipos de lágrimas; basales y de reflejo. En resultados anteriores observamos relativas diferencias en el bandeo de geles de controles (figura 9) al momento de optimizar el protocolo cuando utilizamos más de una tira de Schirmer en un mismo ojo causando una cuantificación inexacta.

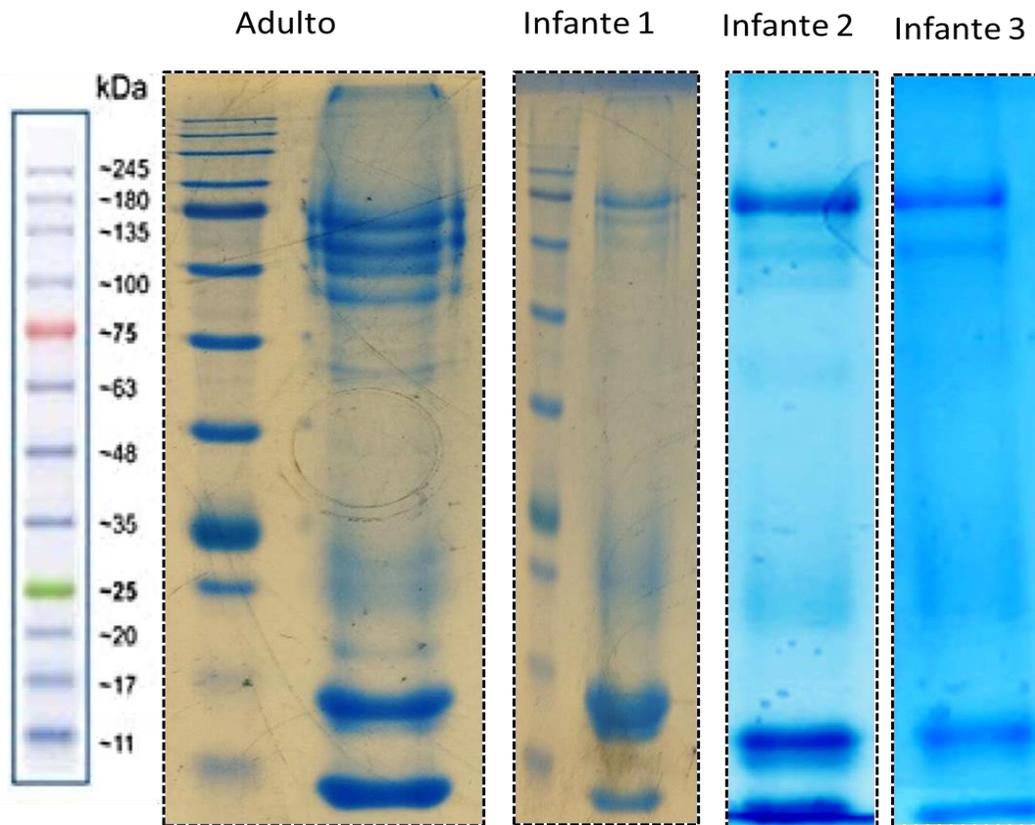


Figura 9.- SDS-PAGE 1D de 4 controles (1 adulto y 3 infantes).

El bandeo de la muestra obtenida en adulto se utilizó una sola tira de Schirmer mientras que en el caso de los 3 infantes se recolectaron lagrimas mediante 2 tiras de Schirmer; la primera se guardó y la segunda se utilizó para optimizar. Al usar la segunda tira obtuvimos lágrimas de reflejo a raíz de la estimulación de la primera tira. Es por esto que en el caso del primer carril hay más expresión de proteínas en comparación con los infantes que al ser lágrimas de reflejo contienen mayor cantidad de agua y una concentración más baja de proteínas que se reflejan en el bandeo. Por lo tanto, quisimos explorar si esas diferencias pudieran deberse a la toma de muestra, ya sea que fueran lagrimas basales o de reflejo.

Se tomaron muestras de un participante mediante el método de Schirmer. La tira utilizada durante este proceso tiene una longitud de 30 mm. Se obtuvo un llenado con mucho cuidado hasta 30 mm en la tira para posteriormente cortarla en 3 fracciones con 10 mm de longitud cada parte. La primera fracción tenía una marca de 0 – 10 mm; la segunda de 10 – 20 mm; la tercera de 20 – 30 mm (figura 10). Cada muestra se cuantifico mediante el ensayo de Bradford (tabla 2) para comprobarlo. El proceso para obtener las proteínas es similar en todas las fracciones. La cuantificación de la fracción 3 es mayor en comparación con la fracción 1 y 2 ya que corresponde a lagrimas basales.



Figura 10.- Toma de lágrimas; basales y reflejo.
La fracción 3 contiene en su mayoría lagrimas basales seguido de las fracciones 1 y 2 las cuales contienen una concentración inferior en comparación con la fracción 3 ya que, como se mencionó anteriormente en su mayoría es agua.

Tabla 2.- Concentración de proteínas; basales y reflejo.

| PROTOCOLO | FRACCIÓN 1 | FRACCIÓN 2 | FRACCIÓN 3 |
|----------------------------|---|---|---|
| Obtención de muestra | 10 mm de volumen en la tira de schirmer | 10 mm de volumen en la tira de schirmer | 10 mm de volumen en la tira de schirmer |
| Extracción de lágrimas | 100 uL de BiCam + Urea 8M + complete | 100 uL de BiCam + Urea 8M + complete | 100 uL de BiCam + Urea 8M + complete |
| Precipitación de proteínas | 6 volúmenes de acetona | 6 volúmenes de acetona | 6 volúmenes de acetona |
| Resuspensión de la muestra | 20 uL TEAB - Urea 8M + complete | 20 uL TEAB - Urea 8M + complete | 20 uL TEAB - Urea 8M + complete |
| Cuantificación | 0.36 ug/uL | 0.42 ug/uL | 1.2 ug/uL |

EXTRACCIÓN DE LAGRIMA CAMBIANDO TEMPERATURA Y TIEMPO.

Continuando con la optimización y en base la literatura, decidimos usar 3 variables. Se procesaron bajo el mismo protocolo excepto que: la tira #1 se dejó 10 min en hielo durante la extracción; la tira #2 se dejó 1 hora a temperatura ambiente durante la extracción; la tira #3 se dejó 1 hora en hielo durante la extracción. Finalmente, se cuantifico la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford (tabla 3).

Tabla 3.- Extracción de lágrimas a distintas temperaturas y tiempos.
Se recolectaron 3 tiras bajo las mismas condiciones para evitar el desbalance de lágrimas basales y de reflejo.

| | Tira #1 | Tira #2 | Tira #3 |
|------------------|---------------|-------------|---------------|
| Cuantificación | 6.77 ug/uL | 10 ug/uL | 6.79 ug/uL |
| Gel 1D al 12% | 20 ug | 20 ug | 20 ug |

Durante los 60 minutos que se deja la muestra a temperatura ambiente creímos que podrían desnaturalizarse algunas proteínas en nuestra muestra, por lo que, decidimos correr un gel 1D para observar si la variabilidad del bandeo se mantenía en todas las condiciones (figura 11). Como se puede observar no hay un cambio en el bandeo bajo las distintas condiciones al momento de extraer la lagrима.

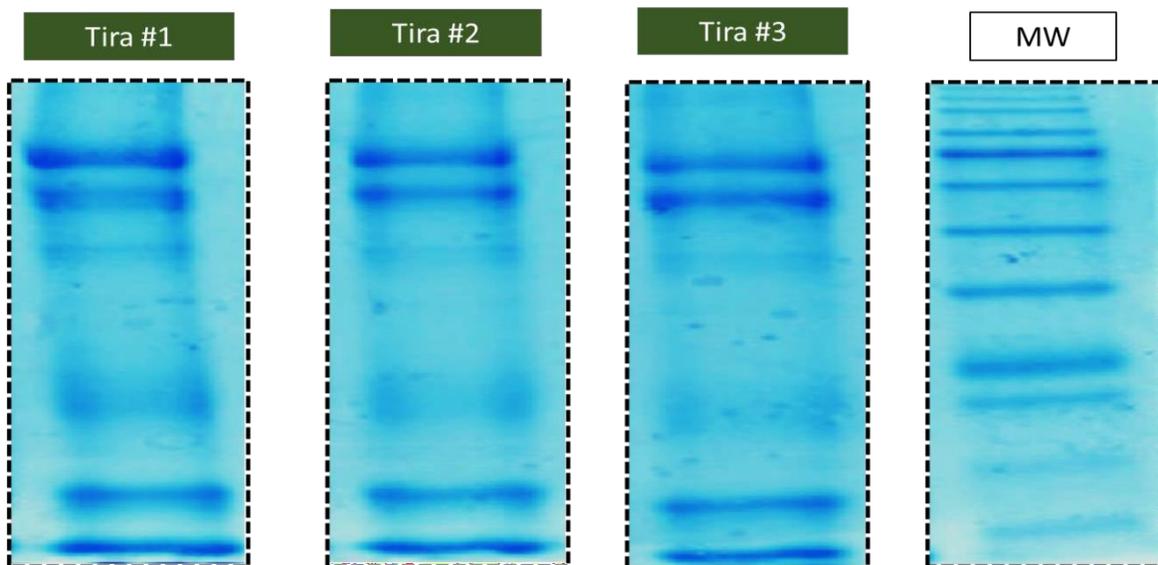


Figura 11.- SDS-PAGE 1D usando distintas condiciones durante la extracción de lágrimas.

DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez optimizado el protocolo para la extracción de proteínas en lágrimas decidimos probar un protocolo dirigido a la digestión de proteínas que fue previamente estandarizado en trabajos anteriores en donde concluimos que la complejidad de la muestra impacta directamente en la eficiencia de su digestión y, por lo tanto, se determinó que la relación tripsina: sustrato no debe ser menor a 1:20, en el caso de proteínas de lagrima.

Usando 10 μ g de proteína de un participante se realizó la digestión de proteínas de lágrimas en solución. Asimismo, se utilizó una tinción con plata para poder observar

el efecto de la tripsina (figura 12). Se cargaron 10 µg de proteínas sin digerir (carril 1) y digeridas (carril 2). Posteriormente, se tiñeron con plata para poder visualizar el efecto de la tripsina. En el carril 1 se observan distintos bandeos los cuales después de la digestión desaparecen.

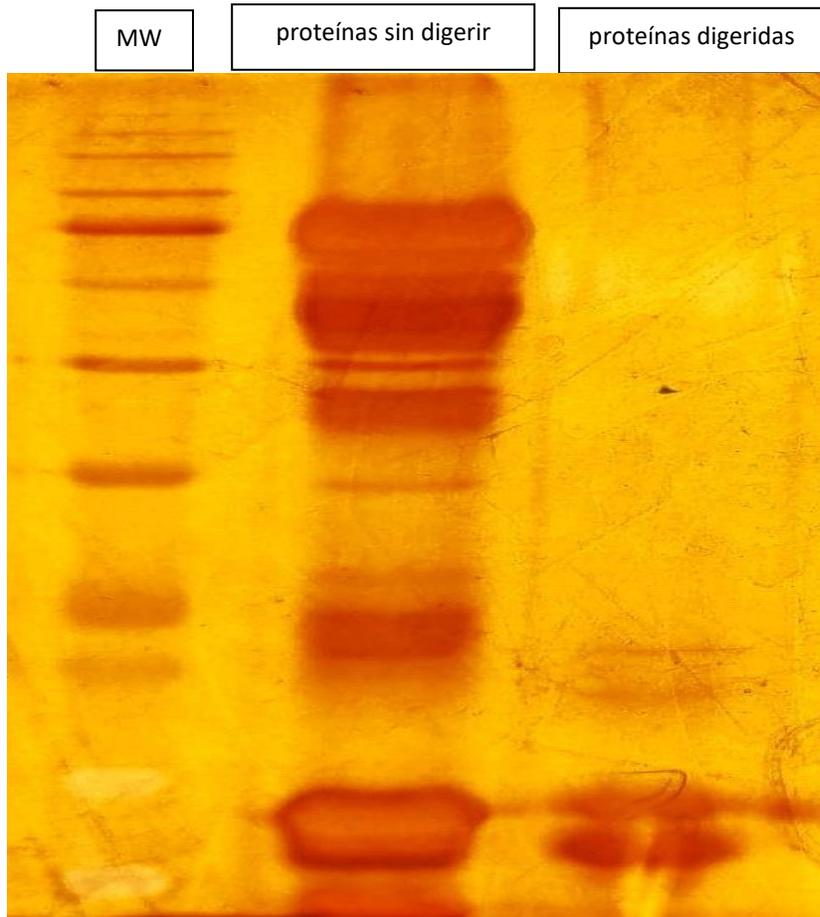


Figura 12.- SDS-PAGE de proteínas digeridas y no digeridas.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE INFANTES CON RETINOBLASTOMA Y CONTROLES

Ya que hemos corroborado que el protocolo de la digestión es el deseado procedimos a visualizar el panorama de proteínas presentes en lágrimas de niños con retinoblastoma y controles. Para obtener estas preciadas muestras se recolectaron durante años a través de la colaboración con el hospital central y

mediante la difusión del retinoblastoma en donde dimos pláticas en escuelas y público en general para de esta manera encontrar posibles casos de retinoblastoma, dar les seguimiento y posteriormente confirmar los casos por los mismos padres. Una vez confirmado el retinoblastoma se le comunico al familiar sobre nuestro trabajo y se le pidió su colaboración para poder obtener muestras (tabla 4).

| RETINOBLASTOMA | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| PARTICIPANTE | Concentración (ug/ μ L) | Volumen (μ L) | Proteínas totales (μ g) | Optimización (μ g) | Total (μ g) | PULL 1 (μ g) |
| 1 | 0.56 | 4 | 2.24 | 0 | 2.24 | 704.97 |
| 2 | 2.35 | 23 | 54.05 | 0 | 54.05 | |
| 3 | 2.91 | 43 | 125.13 | 0 | 125.13 | |
| 4 | 1.21 | 33 | 39.93 | 0 | 39.93 | |
| 5 | 1.67 | 33 | 55.11 | 0 | 55.11 | |
| 15 | 4.81 | 19 | 91.39 | 0 | 91.39 | |
| 16 | 5.49 | 19 | 104.31 | 0 | 104.31 | |
| 17 | 7.14 | 19 | 135.66 | 2 | 133.66 | |
| 18 | 1.7 | 19 | 32.30 | 6 | 26.30 | |
| 19 | 4.15 | 19 | 78.85 | 6 | 72.85 | |

| CONTROLES | | | | | | |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| PARTICIPANTE | Concentración (μ g/ μ L) | Volumen (μ L) | Proteínas totales (μ g) | Optimización (μ g) | Total (μ g) | PULL 2 (μ g) |
| 6 | 1.56 | 28 | 43.68 | 0 | 43.68 | 443.08 |
| 7 | 2.18 | 33 | 71.94 | 0 | 71.94 | |
| 8 | 2.18 | 33 | 71.94 | 0 | 71.94 | |
| 9 | 2.2 | 14 | 30.80 | 0 | 30.80 | |
| 10 | 1.02 | 18 | 18.36 | 0 | 18.36 | |
| 13 | 2.67 | 28 | 74.76 | 0 | 74.76 | |
| 14 | 0.7 | 28 | 19.60 | 0 | 19.60 | |
| 20 | 1.5 | 18 | 27.00 | 0 | 27.00 | |
| 21 | 5 | 17 | 85 | 0 | 85 | |

Tabla 4.- Muestras de retinoblastoma y controles.

Se obtuvieron en total 10 muestras de lágrimas de infantes con retinoblastoma y 9 muestras de lágrimas de infantes control (sanos). Cada muestra se cuantifico mediante el protocolo optimizado.

A continuación, corrimos un SDS-PAGE 1D cargando 1 μg de proteína de 7 muestras de nuestros controles y se tiñeron con plata para lograr observar con detalle la presencia de proteínas (figura 13).

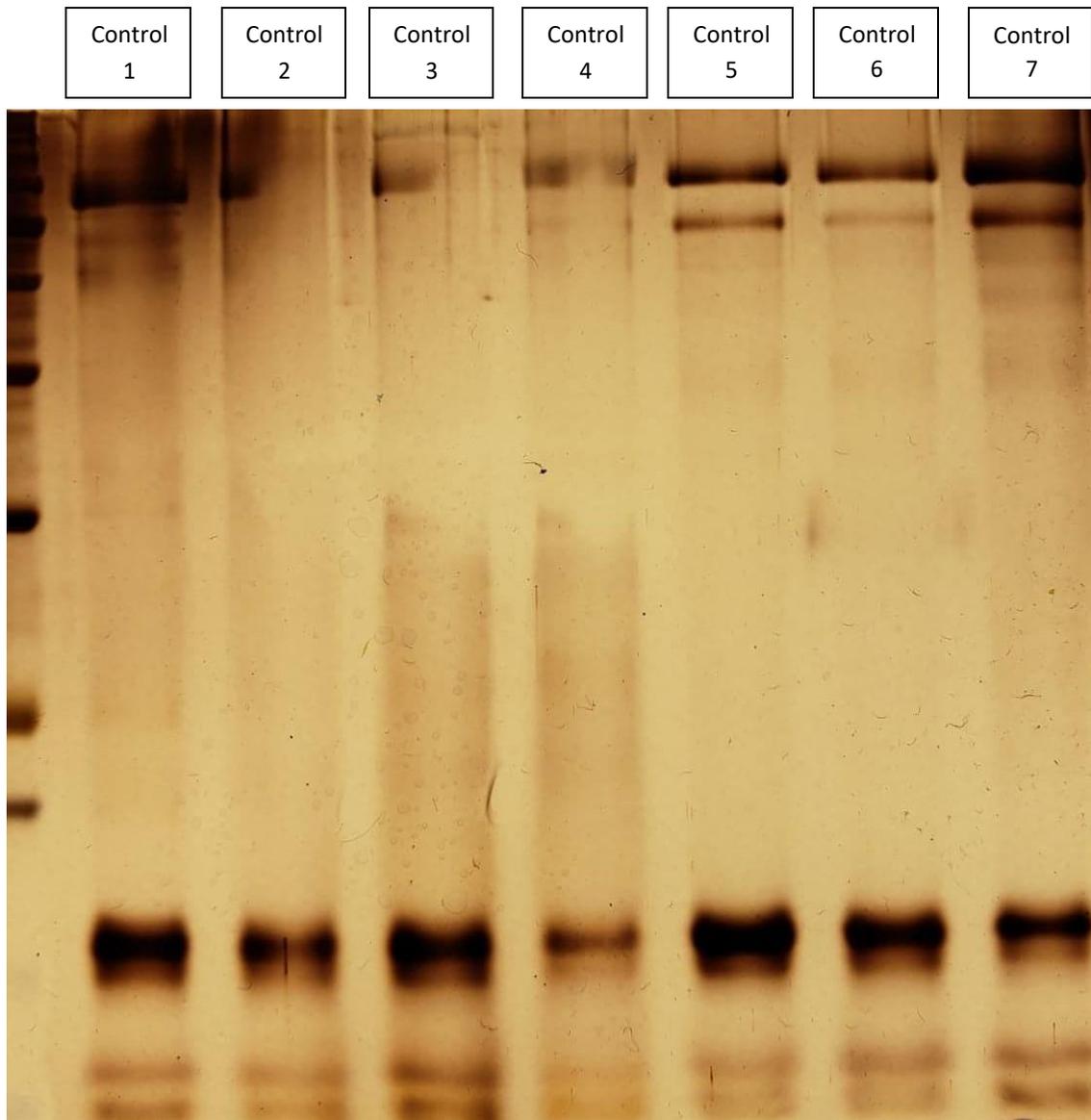


Figura 13.- SDS-PAGE 1D de proteínas en lágrimas de controles sanos teñidas con plata.

Las 7 muestras fueron tratadas con el mismo protocolo ya antes descrito. Se observa un leve bandeo en los extremos.

Después, usando 9 muestras de infantes con retinoblastoma se llevó a cabo un SDS-PAGE 1D el cual fue teñido con plata (figura 14). En comparación con el gel anterior (figura 13) podemos observar una gran diferencia en cuanto la variabilidad del bandeo. Esto nos indica que hay diferentes proteínas presentes en las muestras de lágrimas recolectadas en infantes con retinoblastoma que es el interés principal de nuestro trabajo.

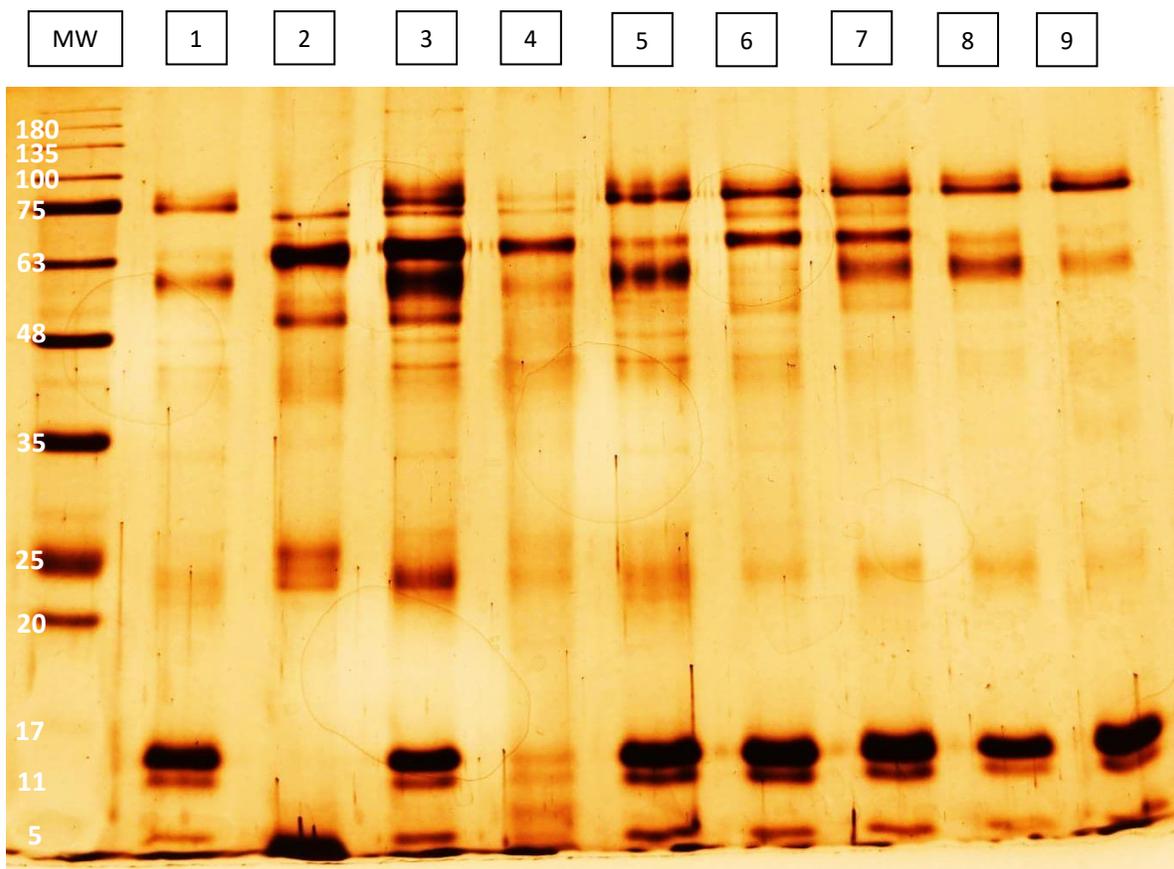


Figura 14.- SDS-PAGE 1D de proteínas en lagrima de infantes con retinoblastoma teñidas con plata.

Las 9 muestras se trataron de manera similar mediante el protocolo optimizado ya descrito. Se observa un mayor bandeo en comparación con controles, específicamente en la parte central de los carriles..

PROTEÍNAS EN RETINOBLASTOMA VS CONTROLES

Para observar la diferencia de proteínas presentes en lágrimas de niños enfermos y sanos, generamos un SDS-PAGE 1D en donde agregamos 1 μg de proteínas tanto de controles sanos como infantes con retinoblastoma. Asimismo, quisimos observar el bandeo de una muestra que no padecía retinoblastoma pero si otra enfermedad para observar si la alteración de proteínas está presente y de esta manera utilizar este ensayo enfocado en otras enfermedades. Como se puede apreciar el bandeo en niños con retinoblastoma (carril 1, 3 y 4) es más heterogéneo e intenso en comparación con los controles sanos (carril 5 y 6). Adicionalmente, agregamos 1 μg de muestra de un infante sin retinoblastoma pero enfermo (carril 2) donde podemos observar un bandeo variable e intenso en comparación con los controles pero similar a las muestras de retinoblastoma (figura 15).

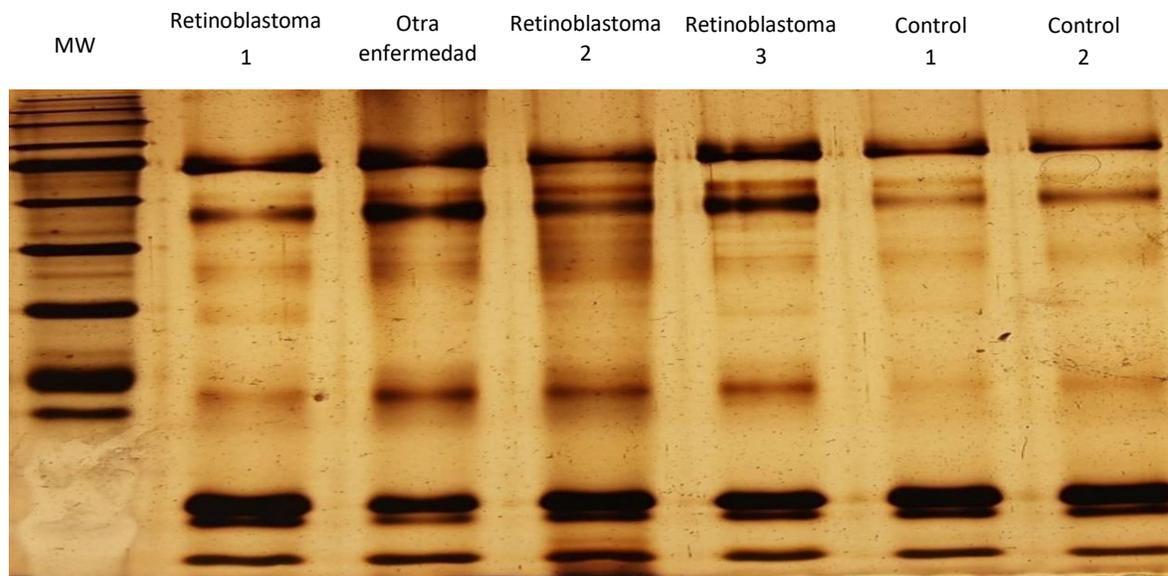


Figura 15.- SDS-PAGE 1D de infantes con retinoblastoma (carril 1,3 y 4), otra enfermedad (carril 2) y controles sanos (5 y 6).

ANÁLISIS DE BANDAS DE RETINOBLASTOMA Y CONTROLES

Decidimos cargar 15 µg de 3 muestras de infantes con retinoblastoma (carril 1, 2 y 3) y 3 de controles sanos (carril 4, 5 y 6) en un SDS-PAGE 1D con 2 concentraciones (arriba 12% y abajo 15%) y se tiñeron con azul de coomassie (figura 16). Como se puede apreciar existen algunas diferencias en cuanto al bandeo por lo que, se eligieron y cortaron distintas bandas que visualmente estaban diferentes dentro del mismo peso molecular (1-15 bandas). De todas ellas se eligieron la numero 4 y 7 para enviarlas a analizar y de esa manera poder conocer las proteínas que son distintas en esa banda en específico de retinoblastoma frente a controles sanos.

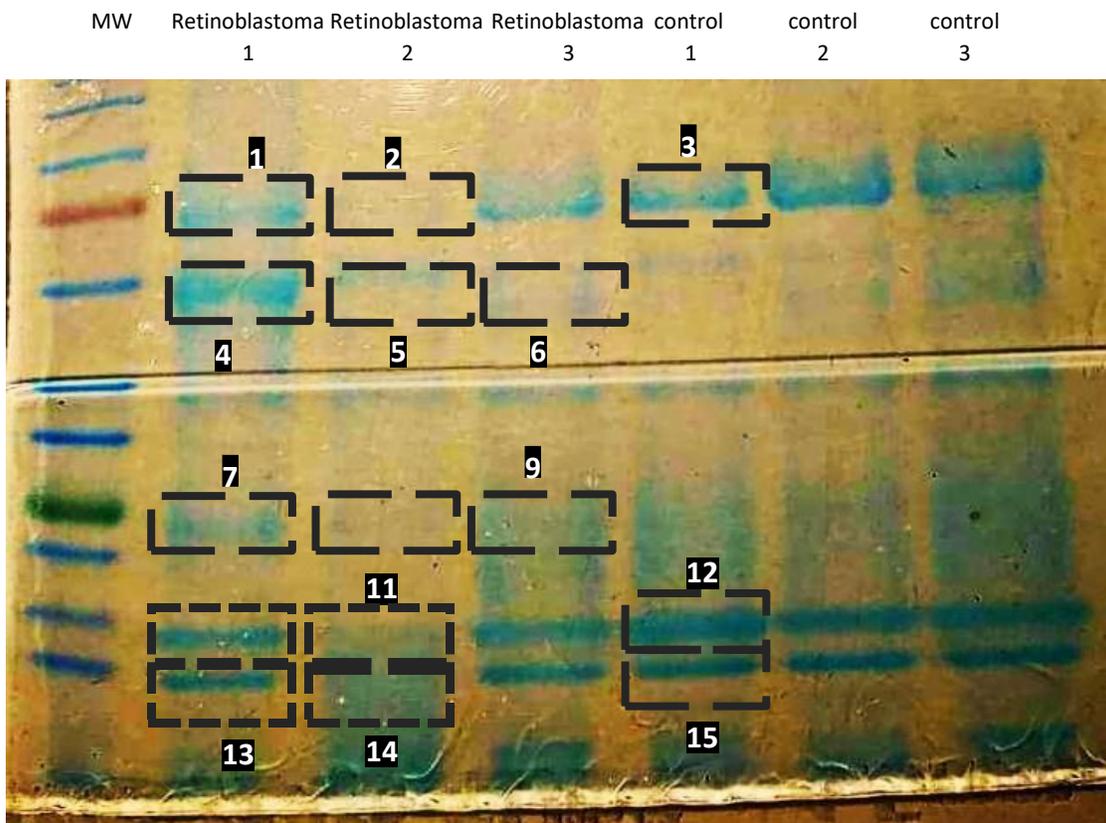


Figura 16.- SDS-PAGE 1D de infantes con retinoblastoma (carril 1, 2 y 3) y controles sanos (carril 3, 4 y 5).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROTEÍNAS

Se enviaron 2 grupos de muestras (retinoblastoma y control) con 150 µg de cada uno y mediante espectrometría de masas (DIA-MS) se identificaron 1536 proteínas en lágrimas. Se lograron cuantificar 1035 en donde 145 se observa son exclusivas de retinoblastoma. Para poder analizar cuales proteínas están sobre o sub expresadas fue necesario aplicar una serie de filtros para obtener proteínas cuantificadas altamente confiables. Partimos de las 1035 proteínas cuantificadas:

1. Se eliminaron los falso positivos (reverse sequence), queratinas y hemoglobinas ya que son proteínas que posiblemente sean contaminación al momento de extraer la lagrima (método de Schirmer) obteniendo 582 proteínas.
2. La proteína debe estar presente en controles sanos y pacientes. Además, se debe identificar al menos 2 péptidos por proteína y un péptido único quedando 529 proteínas.
3. Solo se consideraron proteínas con un CV (coeficiente de variación) igual o menor a 0.20 tanto en controles como en retinoblastoma dejando 256 proteínas.
4. Después de estos filtros solo se conservaron proteínas que tenían un valor- $p \leq 0.05$ con una corrección de Bonferroni (0.00019531) dejando un total de 130.
5. De cada proteína se calculó su proporción (ratio) al dividir la media de retinoblastoma entre la media de los controles sanos y finalmente a cada valor se le aplico un logaritmo base 2 (eje Y) así como también a su valor p

(menor o igual a 0.05 corregido por Bonferroni) un logaritmo negativo base 10 (eje X). Los logaritmos fueron aplicados para eliminar la asimetría y así poder analizar gráficamente las diferencias en la expresión de proteínas en retinoblastoma en comparación con controles sanos (figura 17).

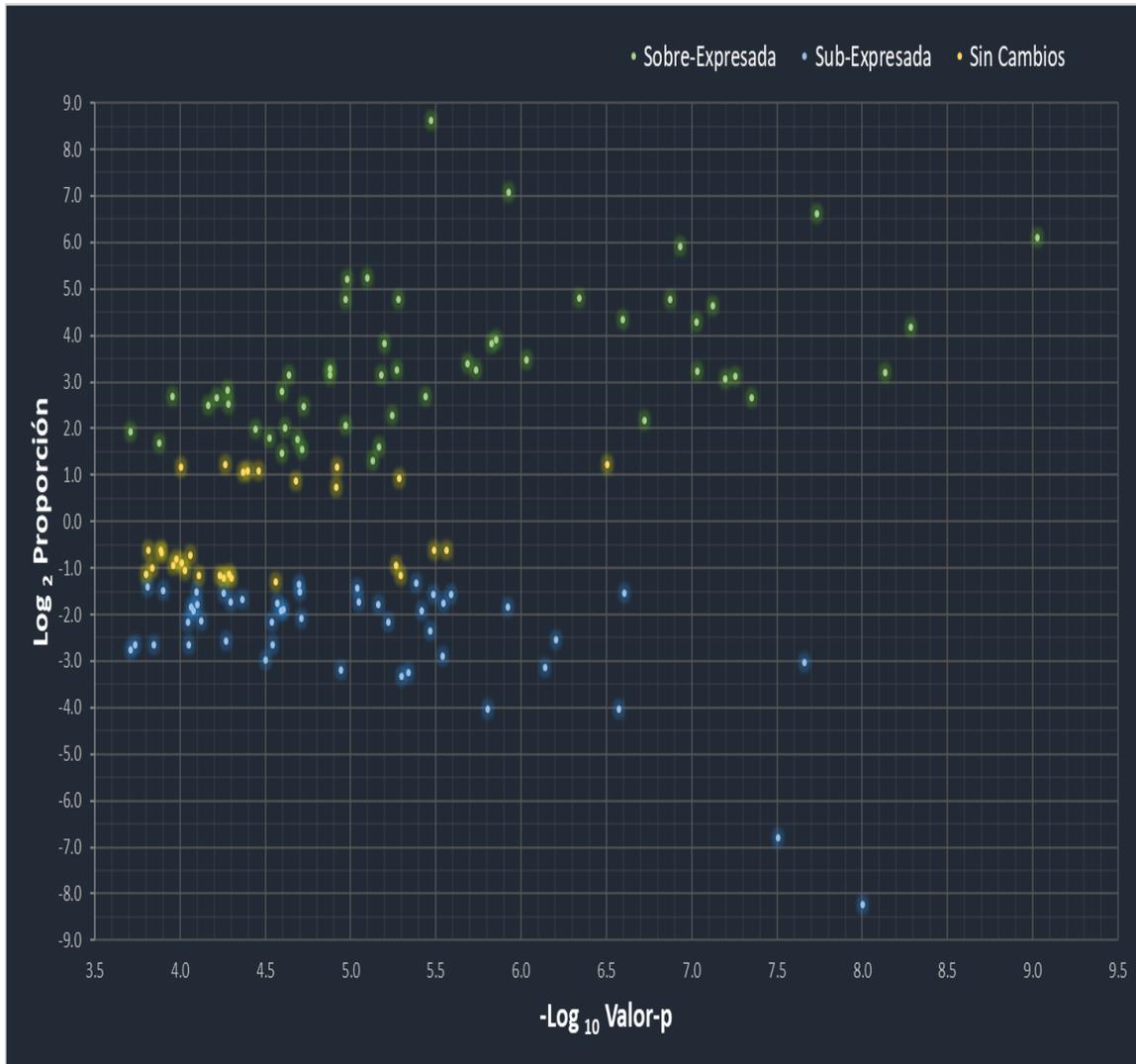


Figura 17.- Expresión de proteínas reguladas al alza o a la baja.

De las 130 proteínas encontradas en retinoblastoma y controles sanos; 52 están sobre expresadas (verde); 48 sub expresadas (azul); 30 sin cambios (amarilla) en retinoblastoma en comparación con controles sanos. Si la proporción (ratio) es mayor o igual a 1.3 se considera sobre-expresada, si es menor o igual a -1.3 se considera sub-expresada y si esta entre 1.3 y -1.3 se consideran proteínas sin cambio.

A partir de nuestros datos estadísticos presentamos las 3 proteínas sobre expresadas con mayor significancia estadística: *Protein S100-A9*, *Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2* y *Alpha-2-macroglobulin*. Así como también para las sub expresadas: *Unconventional myosin-Ig*, *Nesprin-1* y *Transitional endoplasmic reticulum ATPase*.

Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2 o PPIP5K2 (quinasa bifuncional) presenta un aumento en su expresión y en base a la literatura interacciona con un RNA no codificante largo (LncOVM) permitiendo la estabilidad de PPIP5K2 dirigiéndose hacia el aparato de Golgi donde genera una modificación a su estructura haciéndola más compacta implicando la sobre expresión de la proteína GOLPH3 la cual activa el sistema inmune, específicamente el sistema del complemento, liberando así a la enzima C5 convertasa mediante vesículas hacia el espacio extracelular para reclutar a células mieloides (MDSC) que en el contexto de cáncer generan un microambiente tumoral necesario para que se lleve a cabo la metástasis ya que se generan a partir de una hematopoyesis alterada (39).

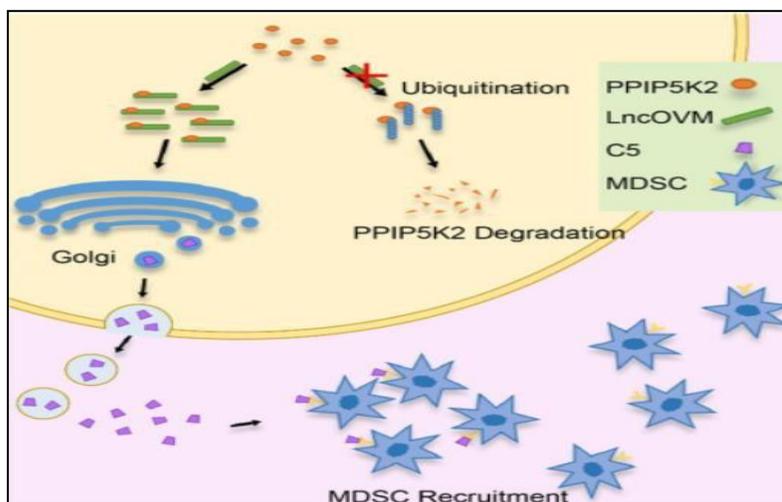


Figura 18.- La estabilidad de PPIP5K2 mediante la interacción con LncOVM permite la liberación de C5 para generar el microambiente necesario para permitir la metástasis.

Ashok Sharma, et al, a través de su trabajo comparo distintas formas para extraer proteínas a partir de tiras de Schirmer de manera más eficiente durante su digestión previo a la espectrometría de masas en individuos sanos. Uno de sus resultados es una lista de 3370 proteínas de las cuales mediante análisis bioestadísticos se reducen a 50, es decir, son las proteínas más representativas de la película lagrimal (40). Comparamos la expresión de estas proteínas con las que obtuvimos por espectrometría de masas donde coinciden 23 proteínas de las cuales 8 están sobre-expresadas (Immunoglobulin heavy constant gamma 3, Actin cytoplasmic 2, Actin alpha skeletal muscle, Albumin, Pyruvate kinase PKM, Aldehyde dehydrogenase 1A1, Glutathione S-transferase P e Immunoglobulin kappa constant), 5 sub-expresadas (Cystatin-S, Lactotransferrin, Extracellular glycoprotein lacritin, Lysozyme C y Prolactin-inducible protein) y 10 sin cambios significativos.

La proteómica como se mencionó anteriormente permite identificar proteínas como biomarcadores confiables o dianas terapéuticas específicas. La proteómica con diferentes tipos de material biológico nos permite obtener diferentes patrones de proteínas. Kandalam Mallikarjuna, et al, usando tejido de retinoblastoma y mediante 2DE-MS/MS ha podido identificar 27 proteínas que se expresan diferencialmente; 11 proteínas reguladas a la baja y 16 reguladas al alza a las cuales se les midió su mRNA que fue consistente con la expresión de proteínas (41). De estas las que más se expresan en retinoblastoma son: CRABP2, peroxiredoxin 6, apolipoprotein A1 y recoverin. Dentro de nuestros datos se encontró expresada diferencialmente a peroxiredoxin 2 y a la Apolipoprotein A1 (material complementario) por lo que son posibles biomarcadores para la detección de retinoblastoma. Kinesin like protein 11

(KIF11) es otra proteína que se ha reportado anteriormente como biomarcador usando el tejido de retinoblastoma (42). KIF11 es una proteína que forma parte de la familia a de kinesinas que se conforma por 14 miembros. Participa principalmente en la división celular, transporte de vesículas y orgánulos. En nuestros datos se ha encontrado a Kinesin-like protein KIF1A al alza lo que posiblemente pueda ser un biomarcador para retinoblastoma.

Usando el humor vitreo como material biológico y mediante proteómica ESI-MS/MS con etiquetado (iTRAQ) se han encontrado algunos biomarcadores como MMP2, TNC, CRABP1 y SOX2 (43). Sin embargo, en nuestro análisis de proteínas no fue posible encontrar proteínas con similitud a las encontradas en humor vitreo. De igual manera se han encontrado biomarcadores que se encuentran en la superficie de las células de retinoblastoma (44). LaminB1 (LMNB1) y transferrin receptor (TFRC) son proteínas que están implicadas en el transporte de iones, así como en la transducción de señales, pero en nuestro análisis de proteínas tampoco se encontraron.

Usando materiales biológicos no invasivos, seguros y preciso para diagnosticar se usó el humor acuoso y suero de pacientes con retinoblastoma (45). Se encontró una proteína que no se correlaciona con el sexo, antecedentes familiares, bilateralidad, tratamiento previo, edad de presentación, edad de enucleación y metástasis por lo que, detectar sus niveles de expresión será de utilidad para el diagnóstico clínico del retinoblastoma (46). Afortunadamente, en nuestros datos del proteoma de la lagrime encontramos esta proteína expresada, aunque sin cambios estadísticos

significativos, es decir sin cambios en su expresión respecto a un control sano usando las lágrimas como material biológico.

CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DETECTADAS

En base a nuestra bioestadística quisimos identificar las rutas biológicas en las cuales están implicadas las proteínas desreguladas en pacientes con retinoblastoma. Para esto caracterizamos funcionalmente a las proteínas que se encontraban desreguladas utilizando el software bioinformático Panther Classification System. La mayoría de las proteínas tienen función de actividad catalítica (33.3%) y de unión (36.8%) (figura 18).

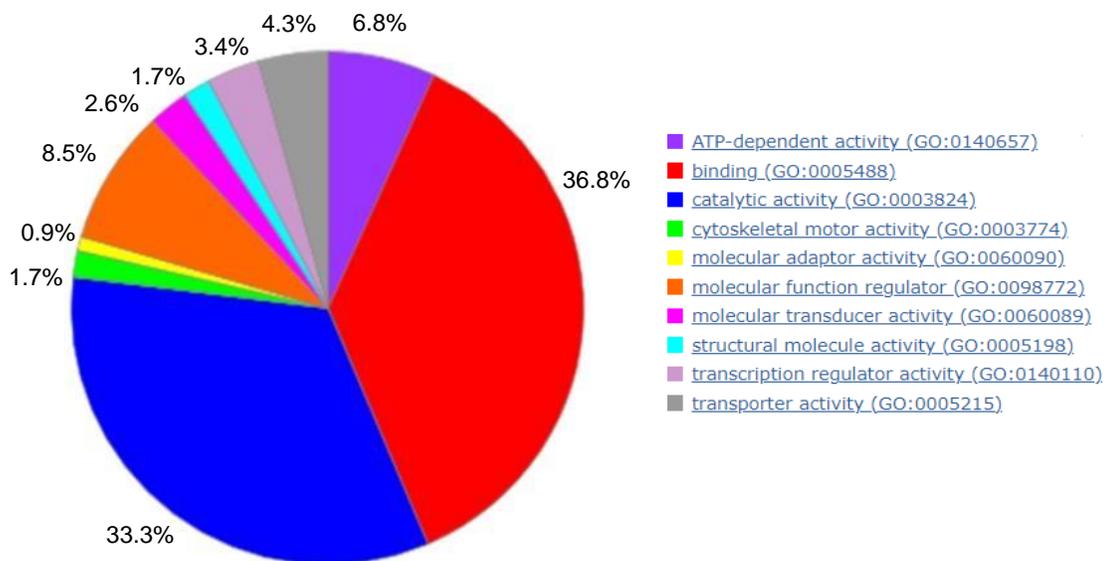


Figura 18.- Clasificación de proteínas desreguladas en base a su función molecular. Se observan 2 grupos principalmente; actividad catalítica y de unión.

Dentro de las proteínas que pueden llevar a cabo tareas catalíticas la mayoría tiene actividad de hidrolasa (35.6%), actividad catalítica actuando sobre una proteína (23.7%) y actividad de transferasa (15.3%) (figura 19).

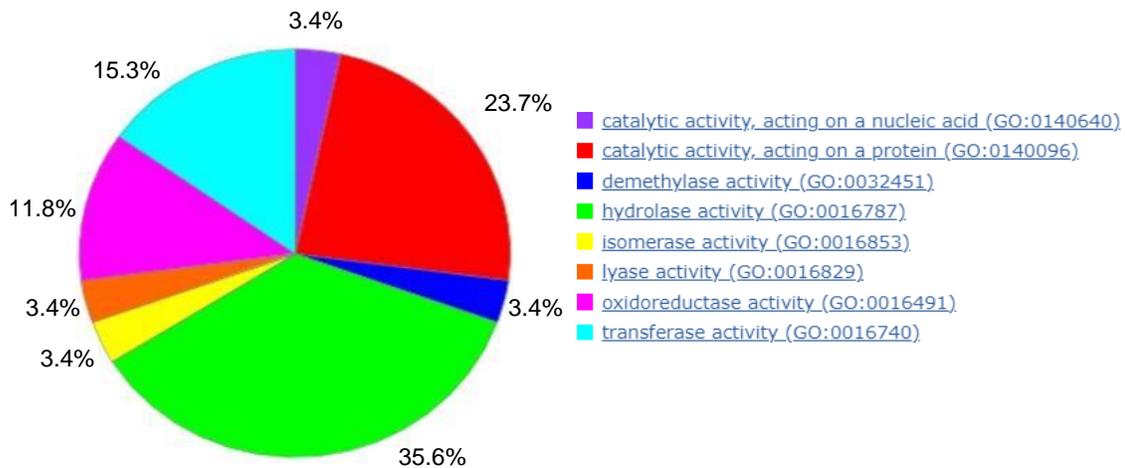


Figura 19.- Clasificación de proteínas identificadas que se dividen en 3 grupos principalmente; actividad de hidrolasa, catalítica sobre otra proteína y actividad de transferasa.

La actividad de hidrolasa se realiza principalmente en anhídridos de ácido (58.3%) (figura 20) de las cuales 5 proteínas están sobre-expresadas y 9 sub-expresadas. Dentro de proteínas al alza destaca Kinesin-like protein (KIF1A) que, como ya se mencionó, pertenece a la familia de KIF11 una proteína que ha sido caracterizada como biomarcador de retinoblastoma utilizando tejido como material biológico (42).

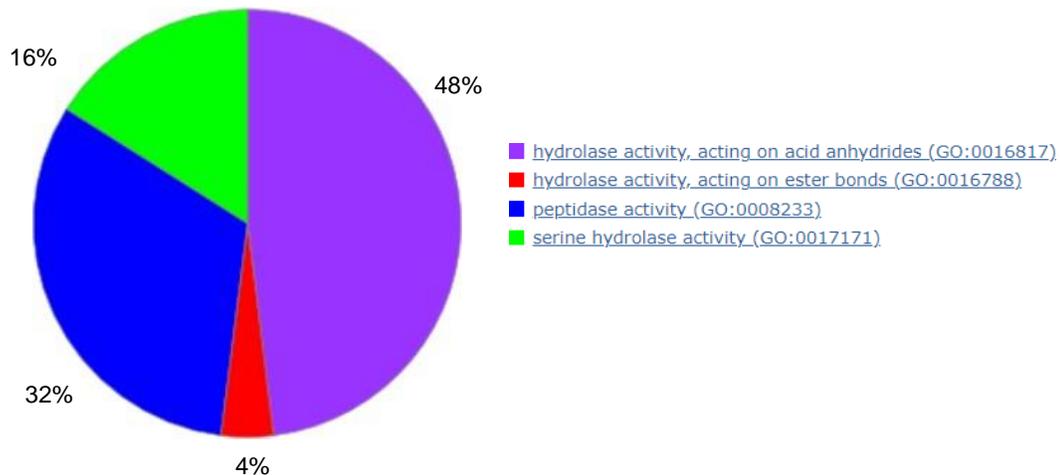


Figura 20.- Clasificación de proteínas identificadas que actúan como hidrolasas en anhídridos de ácidos principalmente.

Dentro de las 9 proteínas reguladas a la baja encontramos a Heat shock 70 kDa protein 6 (HSP70) una proteína que hace frente al estrés celular. Las células se someten a distintas condiciones por lo que se debe mantener una buena homeostasis de sus proteínas ya que un mal plegamiento de alguna proteína puede dirigirse al desarrollo de enfermedades. La proteína de choque térmico HSP70 (por su peso molecular) se expresa exclusivamente en células eucariotas manteniendo la proteostasis (47,48). Dentro de sus muchas funciones hay 2 que destacan: el correcto plegamiento de los polipéptidos recién sintetizados y la degradación de proteínas mal plegadas. Durante el estrés celular los factores de transcripción promueven la expresión de HSP70 generando abundancia de estas proteínas para amortiguar el estrés celular por lo que, un mal funcionamiento o desregulación de las HSP70 se relaciona con distintas enfermedades como el cáncer. Se ha relacionado la regulación a la baja de estas chaperonas con el desarrollo del cáncer de mama ya sea por bloqueo, inhibición o eliminación de HSP70 (49).

Dentro de las proteínas con actividad de unión (figura 18) el 34.8% tienen procesos de unión a otras proteínas (figura 21).

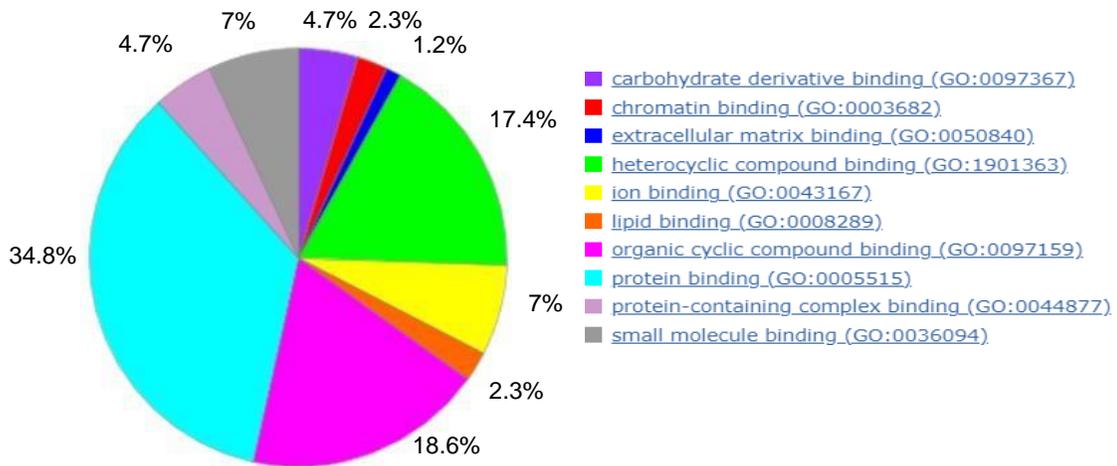


Figura 21.- Clasificación de proteínas implicadas en procesos de unión a otras proteínas.

La actividad de unión a otras proteínas se lleva a cabo principalmente con enzimas (27.3%) y a proteínas del citoesqueleto (27.3%) (figura 22).

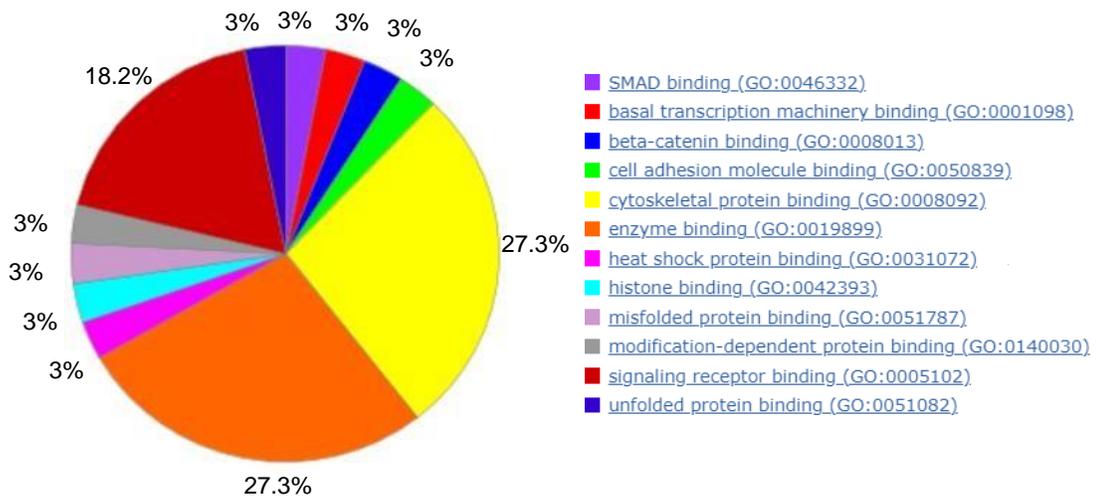


Figura 22.- Clasificación de proteínas implicadas en la unión a otras proteínas donde la mayoría se efectúa con enzimas, pero en un porcentaje similar en proteínas del citoesqueleto.

Dentro de las proteínas del citoesqueleto encontramos 7 proteínas desreguladas; 3 al alza y 4 a la baja. En las proteínas sub-expresadas encontradas en lágrimas hay 2 que son interesantes (cofilin-1 y profilin-1) ya que están relacionadas con el proceso de metástasis en otros tipos de cáncer como el de vejiga, así como otras células malignas (adenocarcinomas, osteosarcoma, neoplasia de tejido linfoide, astrocitoma, glioma y neuroblastoma) (50,51).

La diseminación de células cancerosas (metástasis) necesita una serie de pasos o cascada de eventos que al final permiten a las células tumorales primarias desplazarse y sobrevivir en otros tejidos. Uno de los cambios necesarios para lograr la metástasis es la reorganización del citoesqueleto formando estructuras como filopodios, invadopodios y lamelipodios que son protuberancias que buscan caminos en la quimiotaxis, migración celular e invasión. El evento principal es la transición dinámica de la actina entre su forma monomérica (G-actina) y su forma filamentosa (F-actina) y su reorganización. Para que la célula cancerosa pueda moverse la actina-G en presencia de ATP se reorganiza para formar nuevas adherencias al polimerizarse (actina-F). Subsecuentemente hay una fuerza de retracción y contracción que libera la adhesión celular y es por eso que, la célula puede estirarse, adherirse y liberarse. Como cualquier proceso celular debe existir una regulación, en este caso la regulación de la polimerización de la actina se efectúa vía proteínas de unión a actina (ABP) que regula la despolimerización de actina (actina G y F). Algunas proteínas que regulan este proceso han mostrado propiedades supresoras de tumores como cofilin-1 y profilin-1 (52).

Cofilin-1 se une a actina, despolimerizando a la actina-F en los extremos, generando extremos libres permitiendo la continua polimerización, aumentando la concentración de actina-G. Para mantener la polimerización la profilin-1 actúa manteniendo una reserva de monómeros de ATP-actina-G ya que acelera la producción 1000 veces más en el intercambio de nucleótidos de ADP a ATP. Por lo que, una sobre expresión de estas proteínas en conjunto promueve la aparición de células malignas (52).

Las proteínas de unión a enzimas (figura 22) se encontraron 7 proteínas desreguladas; 5 al alza y 2 a la baja. Se encontró a Heat shock 70 kDa protein 6 a la baja y como anteriormente se menciona es un posible biomarcador (47–49). Finalmente, en este trabajo solo se analizó de manera más específica solo algunas proteínas, pero cabe resaltar que se encontraron 102 proteínas desreguladas además de 136 proteínas que observamos expresadas solo en condición de retinoblastoma.

Usando el software PHANTER para comparar la participación de distintas proteínas desreguladas en procesos biológicos encontramos que el proceso de señalización y proceso metabólico las proteínas a la baja están más presentes. En los demás procesos la cantidad de proteínas implicadas es muy similar (figura 23).

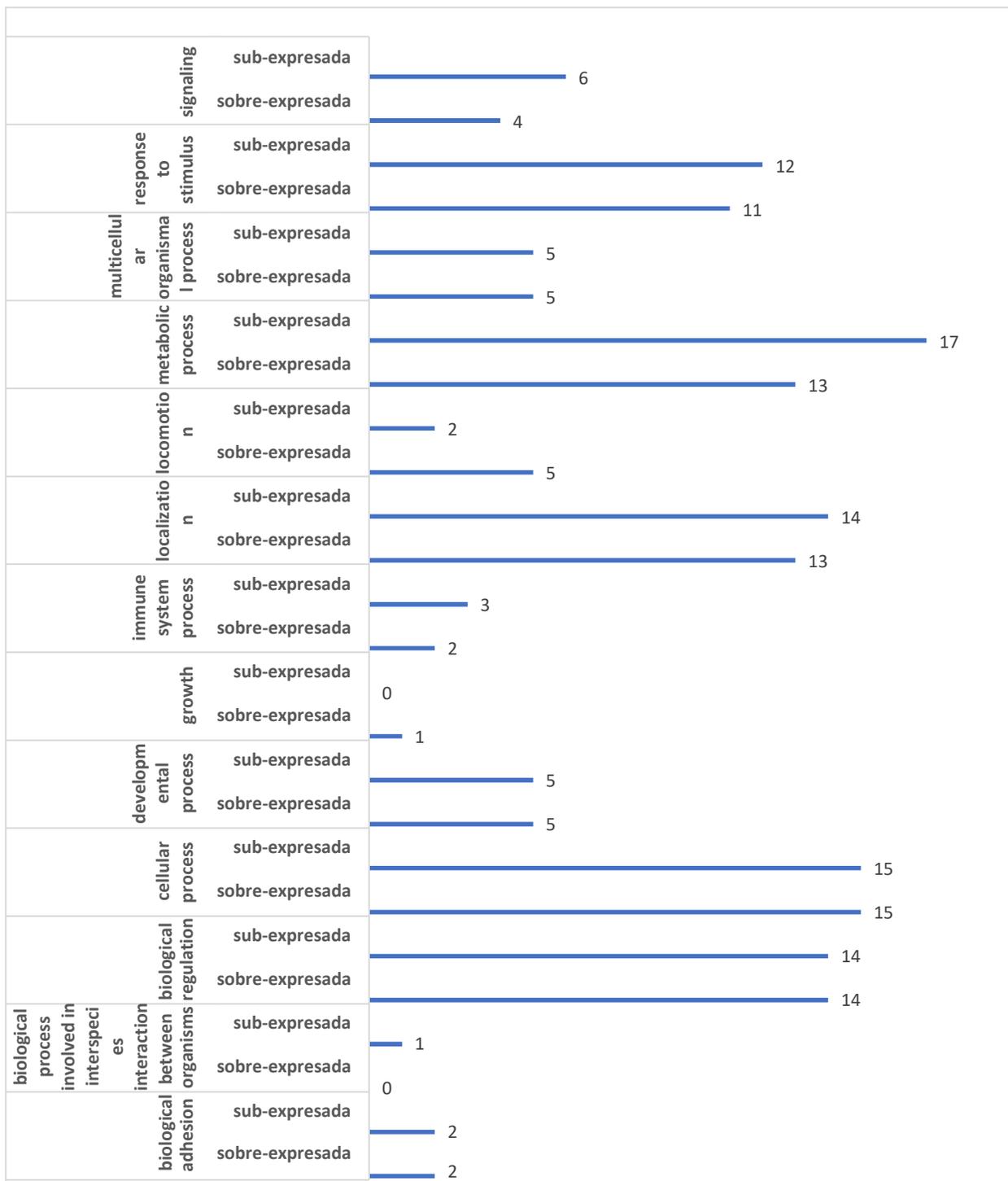


Figura 23.- Proteínas desreguladas implicadas en distintos procesos biológicos.

PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE RETINOBLASTOMA EN LAGRIMAS

Dentro de nuestros datos obtenidos por espectrometría de masas separamos un grupo de proteínas las cuales deben estar presentes en el grupo de retinoblastoma, pero no deben estar en el grupo control. Para esto mediante la cuantificación se eligieron proteínas que presentaban cualquier cantidad en femtomoles y que en el grupo control la cantidad fuera cero. Después se seleccionaron proteínas con un valor-p igual o menor a 0.05. Bajo estos filtros se obtuvo un grupo de 136 proteínas (material complementario) y a continuación mencionamos algunas que posiblemente sean biomarcadores.

Cadherina-11

Las cadherinas están implicadas en el movimiento de células y tejido durante el desarrollo embrionario y la progresión tumoral. En particular la cadherina-11 aumenta durante la invasión de células tumorales e inflamatorias. La cadherina mesenquimatosas, cadherina-11, se ha visto expresada en líneas celulares más invasivas, pero no en líneas celulares no invasivas. Por inmunocitoquímica se ha localizado en la membrana celular y asociada a α y β catenina. Esto sugiere que la cadherina-11 puede funcionar como un fenotipo invasivo y, por lo tanto, un posible biomarcador para tumores más invasivos y agresivos. La cadherina-11 interacciona con otras células malignas y otras que expresen la misma proteína, pero también con la matriz extracelular circundante facilitando la invasión y metástasis (53,54).

RB-associated KRAB zinc finger protein

Esta proteína interactúa con RB1 para funcionar como represor transcripcional de promotores que el factor de transcripción E2F1 promueve. Esta interacción se da mediante su motivo represor transcripcional, la caja asociada a Kruppel, KRAB (55)

Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta

Esta proteína funciona como un punto de control mitótico al regular el ensamblaje del huso mitótico. Se ha informado que su sobreexpresión de BUB1 este asociado con la progresión y pronostico del cáncer. Se ha demostrado que la supresión de la expresión de BUB1 se correlaciona con la disminución del crecimiento celular y la invasión en líneas celulares. Al suprimir la expresión de BUB1 también suprimió la expresión de CD44 y aumento la expresión de p-53 fosforilado (serina 15). En resumen, se muestra que BUB1 juega un papel oncogénico y puede ser un posible biomarcador para retinoblastoma (56).

Epidermal growth factor-like protein 6

EGFL6 es un factor de crecimiento que se ha visto que aumenta en su abundancia en CRC (cáncer colorrectal). Se probó que este aumento se correlaciona con la tumorigénesis y para probarlo se hizo mediante una tinción 1HC. En el hospital de Taiwán (Changhua Christina Hospital) evaluaron la intensidad de la tinción observando que la expresión de EGFL6 estaba presente en cada etapa de CRC pero no había señal en tejidos sanos o normales (57). Es por esto que esta proteína posiblemente sea candidato a biomarcador de retinoblastoma.

DISCUSIÓN

En este trabajo se llevaron a cabo modificaciones dentro de la metodología que estuvieran a nuestro alcance, pero sabemos que existen otras pequeñas modificaciones que pueden ser útiles. Aquí solo mencionamos algunas, pero se investigó incluso la posición de la tira de Schirmer para obtener un mejor ángulo y extraer lagrima de manera más eficiente, así como la implementación de la ultracentrífuga durante la extracción de proteínas, entre otras. Sin embargo, al no observar diferencias considerables no fue agregado a nuestro protocolo final. Pero queda abierta la opción de seguir mejorando el protocolo.

En la figura 15 podemos observar que el protocolo es viable para ser utilizado en otro tipo de enfermedades. Esto lo podemos confirmar ya que durante la optimización del protocolo obtuvimos muestras de un infante con meduloblastoma (figura suplementaria 1).

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

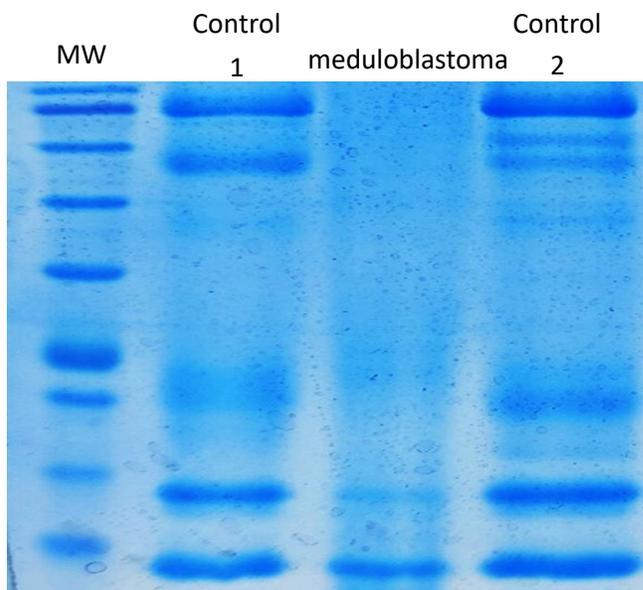
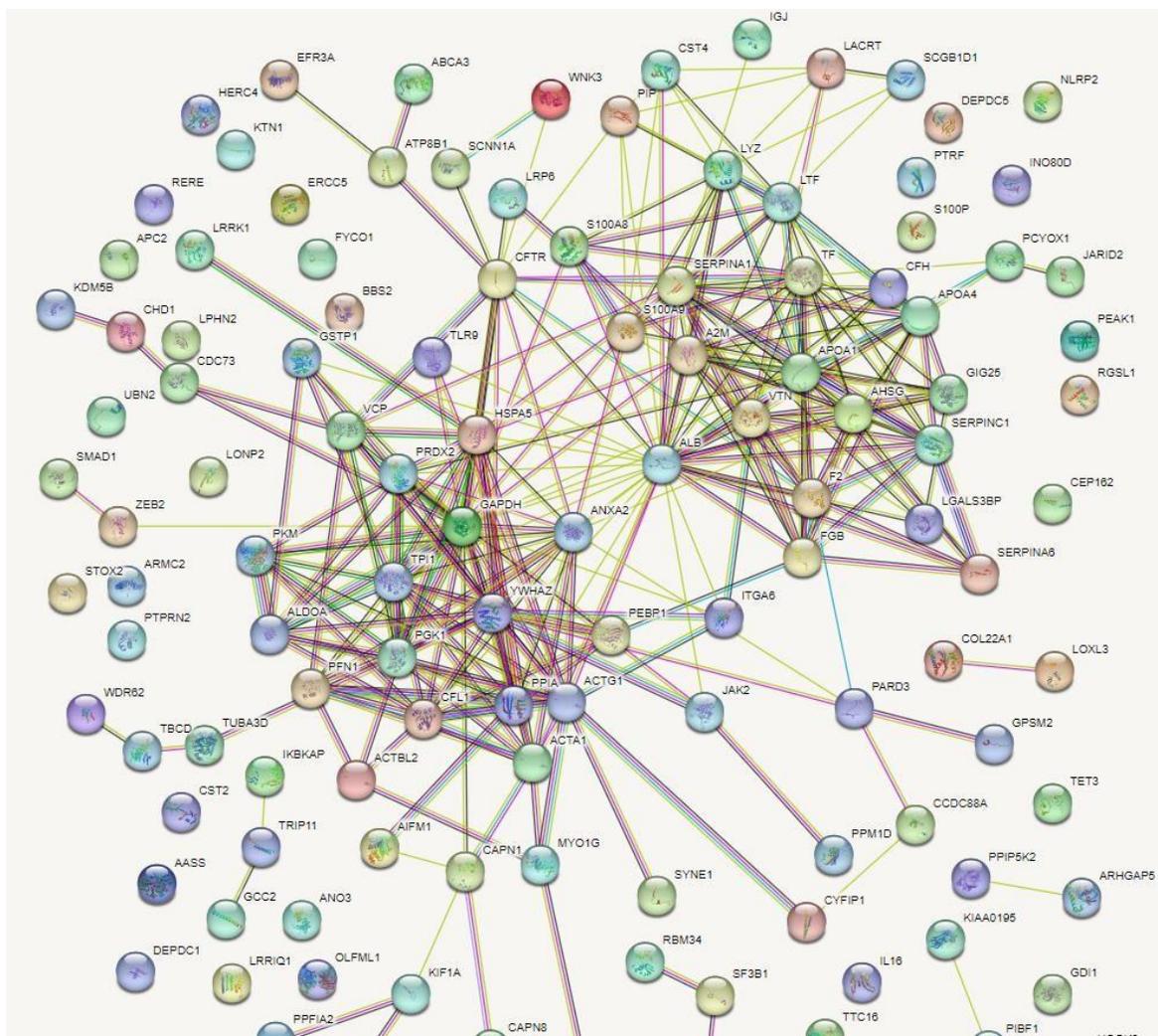


Figura suplementaria 1.- SDS-PAGE 1D de 2 controles sanos y 1 infante con meduloblastoma.

En el carril 1 y 3 se cargaron proteínas de controles sanos mientras que en el carril 2 están colocadas las proteínas de un infante con meduloblastoma donde podemos observar que en el caso de meduloblastoma hay un bandeo más pobre y menos intenso en comparación con los controles.

Es importante aclarar que aquí mostramos específicamente algunas proteínas que hemos encontrado en nuestros resultados por espectrometría de masas pero que obtuvimos muchísimas y, por lo tanto, es importante estudiar detalladamente cada una de ellas para lograr identificar una vía de señalización para poder obtener proteínas viables como dianas terapéuticas. Aquí mostramos un análisis usando el software STRING con el cual nos muestra las interacciones de las proteínas desreguladas en retinoblastoma (figura 24).



CONCLUSIONES

Optimizamos un protocolo que previamente fue creado para maximizar la obtención de proteínas en lágrimas ya que en algunas enfermedades como el retinoblastoma es difícil conseguir muestras además de que no existen protocolos enfocados en niños y mucho menos en retinoblastoma.

El protocolo inicialmente fue enfocado en retinoblastoma pero se implementó para una enfermedad distinta a retinoblastoma obteniendo expresión de proteínas en un gel SDS-PAGE 1D distintas a controles por lo que, al existir distintas neoplasias donde su detección temprana es importante, se podrá usar para encontrar biomarcadores.

Encontramos importante tomar en cuenta la excreción de lágrimas basales y de reflejo para estandarizar protocolos pues estas últimas tienen características distintas como su concentración de proteínas que al final causaran ruido si lo que deseamos es comprar las distintas variables dentro de la metodología observando su efecto final en la concentración de proteínas.

El uso de técnicas como el SDS-PAGE 1D nos permiten en primera estancia observar un panorama de proteínas lo cual nos permite seguir avanzando hacia la espectrometría de masas.

PERSPECTIVAS

Usar el protocolo enfocado no solo a retinoblastoma sino también a otras enfermedades para su detección temprana.

Validar los biomarcadores mediante *Western Blot*.

Estudiar a las proteínas encontradas en lagrime para observar el papel que juegan en el desarrollo del retinoblastoma.

Continuar con la difusión de esta enfermedad y su pronta detección mediante signos.

SOLUCIONES

Bradford

- Se agregan 10 ml de azul reactivo de Bradford y se afora hasta 50 ml con agua destilada. Inmediatamente se cubre con papel aluminio y se reserva en refrigerador a -20°C.

Gel de poliacrilamida al 12%

- Se agrega (receta)

Buffer de corrida

- Se agrega (receta)

Solución fijadora

- 30% etanol + 10% ácido acético + 60% agua destilada (mediante $C_1V_1=C_2V_2$).

Solución sensibilizadora

- 25 mg de ditionito de sodio + 100 ml de agua destilada (siempre fresca).

Solución teñidora

- 80 mg de plata ($AgNO_3$) + 3 uL de formaldehido solución (36 -38%) + 40 mL de agua destilada.

Solución reveladora

- 3 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) + 50 μL de tiosulfato de sodio (stock de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) + 25 μL de formaldehido + 50 ml de agua destilada.

TEAB-Urea 8M

- 2.5 μL TEAB 1M + 2.5 μL H_2O = 5 μL TEAB 0.5 M.
- Urea: $g = (M) (PM) (V) = (8M) (60.06 \text{ g/mol}) (0.005L) = 2.4024 \text{ g}$ para obtener 5 mL de UREA 8M.
- A partir de los 5 μL de TEAB 0.5M aforamos hasta 5 mL con la UREA 8M. finalmente obtenemos 5 mL de UREA-8M.

DTT 50 mM

- $g = (M) (PM) (V) = (50 \times 10^{-3}) (154.25 \text{ g/mol}) (0.003 \text{ L}) = 0.00023 \text{ g}$ en 300 μL de H_2O .

IAA (Iodoacetamida)

- $g = (M) (PM) (V) = (200 \times 10^{-3} \text{ M}) (184.96 \text{ g/mol}) (0.0005 \text{ L}) = 0.018 \text{ g}$.

TEAB 50 mM

- A partir de TEAB 1M y $C_1V_1=C_2V_2$ despejamos V_1 .
- $V_1 = (300 \mu\text{L}) (50 \text{ mM}) / 1 \text{ M}$ para obtener 300 μL de TEAB 50 mM.

BiCam 100 mM + Urea 8M

- BiCam 100 mM.
- $g = (M) (V) (PM)$.
- $g = (100 \times 10^{-3}M) (0.03 \text{ L}) (79.09 \text{ g/mol}) = 0.118 \text{ g}$.

- Urea 8M
- $g = (M) (V) (PM) = (8M) (60.06 \text{ g/mol}) (0.03L) = 14.41 \text{ g}$
- juntamos ambos compuestos y llenamos hasta 30 mL para hacer viales de 1 mL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gallie BL, Helen Dimaras R, Kimani K, O Dimba EA, Gronsdahl P, White A, et al. Retinoblastoma. *Lancet* [Internet]. 2012;379:1436–82. Available from: www.thelancet.com
2. Davies HR, Broad KD, Onadim Z, Price EA, Zou X, Sheriff I, et al. Whole-genome sequencing of retinoblastoma reveals the diversity of rearrangements disrupting RB1 and uncovers a treatment-related mutational signature. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 2;13(4):1–19.
3. Knudson AG. *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. Vol. 68. 1971.
4. Manrique M, Akinbolue D, Madigan WP, Bregman J. Update on the Treatment of Retinoblastoma. *Neoreviews*. 2021;22(7):e423–37.
5. Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L. Retinoblastoma. Vol. 1, *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006.
6. Ortiz M v., Dunkel IJ. Retinoblastoma. *J Child Neurol*. 2016 Feb 1;31(2):227–36.
7. Moreno F, Sinaki B, Fandiño A, Dussel V, Orellana L, Chantada G. A population-based study of retinoblastoma incidence and survival in Argentine children. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(9):1610–5.
8. Garza-Garza LA, Ruiz-Lozano RE, Rebolledo-Méndez G, Ibarra-Nava I, Morales-Garza HJ, Ancona-Lezama D. Challenge of Retinoblastoma in Mexico in 2020: Perspectives and Solutions. Vol. 2020, *Journal of Ophthalmology*. Hindawi Limited; 2020.
9. Mendoza PR, Grossniklaus HE. The Biology of Retinoblastoma. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2015. p. 503–16.
10. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 May 18;14(5):297–306.
11. Xu XL, Singh HP, Wang L, Qi DL, Poulos BK, Abramson DH, et al. Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature*. 2014 Sep 24;514(7522):385–8.
12. Mcevoy J, Nagahawatte P, Finkelstein D, Richards-Yutz J, Valentine M, Ma J, et al. Oncotarget 438 www.impactjournals.com/oncotarget RB1 gene inactivation by chromothripsis in human retinoblastoma [Internet]. Vol. 5, *Oncotarget*. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
13. Rushlow DE, Mol BM, Kennett JY, Yee S, Pajovic S, Thériault BL, et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol*. 2013 Apr;14(4):327–34.
14. Karcioğlu ZA. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) for retinoblastoma. *Retina*. 2002 Dec;22(6):707–10.
15. Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2012 Nov;31(6):527–50.

16. Stuchell RN, Farris RL, Mandel ID. Basal and reflex human tear analysis. II. Chemical analysis: lactoferrin and lysozyme. *Ophthalmology*. 1981 Aug;88(8):858–61.
17. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics*. 2012 Jul 16;75(13):3877–85.
18. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Vol. 6, *Molecular Oncology*. John Wiley and Sons Ltd; 2012. p. 140–6.
19. Easton DF, Ford D, Timothy Bishop ' D. Breast and Ovarian Cancer Incidence in BRCA I-Mutation Carriers. Vol. 56, *Am. J. Hum. Genet*. 1995.
20. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19–50.
21. Manuel González-Buitrago J, Ferreira L, del Carmen Muñiz M. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med Clin (Barc)*. 2008 Oct;131(11):426–34.
22. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998 Aug;19(11):1853–61.
23. Mischak H, Apweiler R, Banks RE, Conaway M, Coon J, Dominiczak A, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl*. 2007 Feb;1(2):148–56.
24. Albright JC, Dassenko DJ, Mohamed EA, Beussman DJ. Identifying gel-separated proteins using in-gel digestion, mass spectrometry, and database searching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2009 Jan;37(1):49–55.
25. Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1992 May;203(1):173–9.
26. Swart C, Martínez-Jaime S, Gorka M, Zander K, Graf A. Hit-Gel: Streamlining in-gel protein digestion for high-throughput proteomics experiments. *Sci Rep*. 2018 Dec 5;8(1):8582.
27. Issaq HJ, Veenstra TD. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):697–700.
28. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:1–6.
29. Kondo T. Tissue proteomics for cancer biomarker development - Laser microdissection and 2D-DIGE -. *BMB Rep*. 2008 Sep 30;41(9):626–34.
30. Veenstra TD. Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Feb 15;847(1):3–11.

31. Patel VJ, Thalassinos K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, et al. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J Proteome Res.* 2009 Jul;8(7):3752–9.
32. Brott NR, Ronquillo Y. Schirmer Test. 2022.
33. Perumal N, Funke S, Wolters D, Pfeiffer N, Grus FH. Characterization of human reflex tear proteome reveals high expression of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4). *Proteomics.* 2015 Oct;15(19):3370–81.
34. ceh_24_76_045.
35. Ernst O, Zor T. Linearization of the bradford protein assay. *J Vis Exp.* 2010 Apr 12;(38).
36. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850–8.
37. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis.* 2008 Mar 7;14:456–70.
38. Schirmer’s test.
39. Li Y, Zhang Q, Wu M, Zhang P, Huang L, Ai X, et al. Suppressing MDSC Infiltration in Tumor Microenvironment Serves as an Option for Treating Ovarian Cancer Metastasis. *Int J Biol Sci.* 2022;18(9):3697–713.
40. Jones G, Lee TJ, Glass J, Rountree G, Ulrich L, Estes A, et al. Comparison of Different Mass Spectrometry Workflows for the Proteomic Analysis of Tear Fluid. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 19;23(4):2307.
41. Mallikarjuna K, Sundaram CS, Sharma Y, Deepa PR, Khetan V, Gopal L, et al. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors. *Proteomics Clin Appl.* 2010 Apr;4(4):449–63.
42. Danda R, Ganapathy K, Sathe G, Madugundu AK, Ramachandran S, Krishnan UM, et al. Proteomic profiling of retinoblastoma by high resolution mass spectrometry. *Clin Proteomics.* 2016 Dec 26;13(1):29.
43. Naru J, Aggarwal R, Singh U, Mohanty AK, Bansal D, Mangat N, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in vitreous humor of patients with retinoblastoma using iTRAQ-coupled ESI-MS/MS approach. *Tumour Biol.* 2016 Oct;37(10):13915–26.
44. Danda R, Ganapathy K, Sathe G, Madugundu AK, Krishnan UM, Khetan V, et al. Membrane Proteome of Invasive Retinoblastoma: Differential Proteins and Biomarkers. *Proteomics Clin Appl.* 2018;12(5):e1700101.
45. Danda R, Ganapathy K, Sathe G, Madugundu AK, Krishnan UM, Khetan V, et al. Membrane Proteome of Invasive Retinoblastoma: Differential Proteins and Biomarkers. *Proteomics Clin Appl.* 2018;12(5):e1700101.

46. Abramson DH, Piro PA, Ellsworth RM, Kitchin FD, McDonald M. Lactate dehydrogenase levels and isozyme patterns. Measurements in the aqueous humor and serum of retinoblastoma patients. *Arch Ophthalmol*. 1979 May;97(5):870–1.
47. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm (Beijing)*. 2022 Sep 2;3(3).
48. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):324–32.
49. Alberti G, Vergilio G, Paladino L, Barone R, Cappello F, Conway de Macario E, et al. The Chaperone System in Breast Cancer: Roles and Therapeutic Prospects of the Molecular Chaperones Hsp27, Hsp60, Hsp70, and Hsp90. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 14;23(14):7792.
50. Shishkin S, Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 22;18(1):10.
51. Wang F, Wu D, Fu H, He F, Xu C, Zhou J, et al. Cofilin 1 promotes bladder cancer and is regulated by TCF7L2. *Oncotarget*. 2017 Nov 3;8(54):92043–54.
52. Coumans JVF, Davey RJ, Moens PDJ. Cofilin and profilin: partners in cancer aggressiveness. *Biophys Rev*. 2018 Oct 19;10(5):1323–35.
53. Langhe RP, Gudzenko T, Bachmann M, Becker SF, Gonnermann C, Winter C, et al. Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell–substrate adhesion. *Nat Commun*. 2016 Apr 8;7(1):10909.
54. J. Pishvaian M, M. Feltes C, Thompson P, J. Bussemakers M, A. Schalken J, W. Byers S. Cadherin-11 Is Expressed in Invasive Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59:947–52.
55. Skapek SX, Jansen D, Wei TF, McDermott T, Huang W, Olson EN, et al. Cloning and characterization of a novel Kruppel-associated box family transcriptional repressor that interacts with the retinoblastoma gene product, RB. *J Biol Chem*. 2000 Mar 10;275(10):7212–23.
56. Sekino Y, Han X, Kobayashi G, Babasaki T, Miyamoto S, Kobatake K, et al. BUB1B Overexpression Is an Independent Prognostic Marker and Associated with CD44, p53, and PD-L1 in Renal Cell Carcinoma. *Oncology*. 2021;99(4):240–50.
57. Sung TY, Huang HL, Cheng CC, Chang FL, Wei PL, Cheng YW, et al. EGFL6 promotes colorectal cancer cell growth and mobility and the anti-cancer property of anti-EGFL6 antibody. *Cell Biosci*. 2021 Dec 16;11(1):53.