

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología Experimental



Casa abierta al tiempo

**Análisis Proteómico del Suero de Ratas con Cáncer Después de la
Administración del Tratamiento de Papaína y DNAsa1**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

Biól. Desiree Ariadna De La Cruz Sigüenza

COMITÉ TUTORAL

Dr. Alfonso Dueñas González

Dr. Humberto González Márquez

Dra. Catalina Trejo Becerril

México, D.F.

Marzo 2015

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: "Análisis Proteómico del Suero de Rata Después del Tratamiento de Papaína y DNAsal ", que presentó: **Desiree Ariadna De La Cruz Sigüenza**, El día 06 de Marzo del año 2015.



Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana -Itztapalapa

(Presidente)



Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Instituto Nacional de Medicina Genómica -INMEGEN

(Secretario)



Dra. Catalina Trejo Becerril
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

(Vocal)



Dr. Zeferino Enrique Pérez Cárdenas
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

(Vocal)

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT y CVU del becario: 283834 y 482556

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y en la unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Comité Tutorial

Dr. Alfonso Dueñas Gonzáles
Director Externo
Investigador en Ciencias Médicas “F”
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

Dr. Humberto Gonzales Márquez
Co-Director Interno
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana.

Dra. Catalina Trejo Becerril
Asesor Externo
Investigador en Ciencias Médicas “D”
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: “Análisis Proteómico del Suero de Rata Después del Tratamiento de Papaína y DNAsal ”, que presentó: **Desiree Ariadna De La Cruz Sigüenza**, El día 06 de Marzo del año 2015.

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz (Presidente)
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda (Secretario)
Investigador en Ciencias Médicas “C”
Instituto Nacional de Medicina Genómica –INMEGEN

Dra. Catalina Trejo Becerril (Vocal)
Investigador en Ciencias Médicas “C”
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

Dr. Zeferino Enrique Pérez Cárdenas (Vocal)
Investigador en Ciencias Médicas “C”
Instituto Nacional de Cancerología, INCAN

Este trabajo lo dedico con mucho cariño:

A mi **padre** Julio De La Cruz, quien me ha enseñado a disfrutar de la vida brindándome todo su amor y cariño.

A mi **madre** Isabel Sigüenza, quien me ha apoyado en cada momento y a quien debo la persona que soy.

Agradezco a los miembros del jurado, por la revisión de esta tesis ya que sus aportaciones enriquecieron este trabajo:

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Dr. Enrique Pérez Cárdenas.

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Alfonso Dueñas Gonzáles.

Dr. Humberto Gonzáles Márquez.

Dra. Catalina Trejo Becerril.

A la unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica:

Candidato a Dr. Sergio A. Román González

Dra. Diana Aparicio Bautista

Q.F.B. David Escobedo Ríos

Q.F.B. María de Monserrat Rojano Bilchis

Agradezco de forma especial:

Al Dr. Enrique Pérez Cárdenas y a la Dra. Catalina Trejo Becerril por sus consejos y apoyo académico durante la elaboración de este trabajo .

A mis compañeros de laboratorio, Blanca, Mauricio, Catita y a la Dra Lucy por haberme brindado su amistad y hacerme sentir dentro de una familia.

A mi familia defeña, mis tíos, Josefina y Joel Velasco por haberme recibido en su casa y hacerme parte de su familia a pesar de no conocerme.

A mis amigos del INCAN, Héctor, Poncho y Monse por acompañarme en las largas tardes de experimentos.

A mi mejor amiga Odette, que pese a las actividades que nos separan estuviste siempre apoyándome.

Índice

Introducción.....	1
DNA circulante.....	2
Enzimas como terapia para el cáncer	3
DNAsa I.....	4
Proteasas	5
Papaína.....	6
Modelos para el estudio del cáncer	6
Modelo de C6	7
Proteómica.....	7
Electroforesis en 2 Dimensiones.....	8
Espectrometría de Masas	9
Identificación de proteínas	10
Antecedentes.....	11
Justificación.....	12
Pregunta de investigación	13
Hipótesis.....	13
Objetivo General	14
Objetivos específicos.....	14
Material y Métodos	15
Obtención del suero.....	15
Extracción DNA Circulante a partir de suero	15
Análisis Proteómico.....	16
Eliminación de proteínas abundantes de suero.....	16
Separación de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE).....	16
Separación de proteínas por Electroforesis en 2 Dimensiones (2D SDS-PAGE)....	17
Separación de la primera dimensión: Separación por isoelectroenfoque.....	17
Segunda dimensión: Separación por electroforesis SDS-PAGE.....	17

Extracción y digestión de las proteínas a partir del gel	17
Separación de los geles.....	17
Reducción y Alquilación.....	18
Digestión de tripsina en gel.....	18
Extracción de los péptidos.....	18
Análisis MS/MS.....	18
Resultados.....	19
Modelo <i>in vivo</i>.....	19
Efecto del tratamiento sobre las proteínas séricas <i>in vivo</i>.....	21
Eliminación de las proteínas abundantes del suero.....	22
Geles 2D SDS-PAGE.....	26
Análisis por Espectrometría de Masas de controles.....	29
Geles en 2D de sueros tratados con Papaína y DNAsaI.....	34
Discusión.....	35
Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	41
Referencias.....	42
Anexos Resultados Protein pilot.....	47

Índice de Figuras

Figura 1. Tumorigénesis y transformación de células murinas después de la transfección pasiva.	2
Figura 2. Esquema general de un espectrómetro de masas.	9
Figura 3. Corte histológico de los tumores generados por la línea celular c6.....	20
Figura 4. Concentración de DNA circulante en suero de ratas con tumor más tratamiento.	21
Figura 5. Geles representativos de poliacrilamida en gradiente de 5-20%, con un gel al final de 25%, donde se muestran las proteínas de suero de ratas tratadas con Papaína y DNAsa I tomadas en tiempos crecientes.....	22
Figura 6. Geles de poliacrilamida al 10% donde se muestran las proteínas de suero de ratas sin tratamiento tras la purificación con las columnas “Seppro Rat Spin Columns”.	23
Figura 7. Perfil de elución del suero de ratas sin tratamiento monitoreadas a 280 nm	25
Figura 8. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra la fracción de proteínas abundantes separadas con la columna de inmunoafinidad de para HPLC (Agilent H6 4.6mm x 100mm).	26
Figura 9. Geles 2D SDS-PAGE de sueros controles de 7 cm de longitud con gradiente de pH de 3-10.....	27
Figura 10. Geles 2D SDS-PAGE de suero de controles, de 7cm de longitud con gradiente pH de 4-7.	27
Figura 11. Geles 2D SDS-PAGE de suero de ratas control, de 18 cm de longitud con gradiente de pH de 4-7.....	28

Figura 12. Diferencias entre las proteínas identificadas en el suero de ratas con tumor comparadas con las identificadas en el suero de ratas sanas.	33
--	----

Índice de Tablas

Tabla 1. Volumen tumoral y dosis aplicadas de Papaína y DNAsal.	19
Tabla 2. Separación Cromatográfica con Columna de Inmunoafinidad	24
Tabla 3. Resultados Espectrometría de Masas, "Spots" de la Figura 9	30
Tabla 4. Resultado Espectrometría de Masas "Spots" de la Figura 11.....	31
Tabla 5. Proteínas Identificadas en Ratas con Tumor Comparadas con las identificadas en Ratas Sanas.....	34

Resumen

Antecedentes: existen evidencias que el DNA circulante tiene capacidad transformante y que induce progresión tumoral *in vivo*. Sin embargo, se desconocen muchos aspectos del mecanismo por el cual produce dichos efectos, pero se sabe que no se encuentra “desnudo” sino asociado a complejos proteicos y que su capacidad transformante y de progresión tumoral no se inhibe solo con DNAsas sino que requiere también proteasas para que el DNA pueda ser degradado. Se desconoce si las proteasas inhiben el proceso de transformación sólo por facilitar la degradación del DNA o si ésta inhibición también resulta de cambios “anti-tumorales” en el proteoma.

Objetivo: Investigar los cambios en el proteoma del suero que resultan del tratamiento intravenoso con DNAsa I y la proteasa papaína en ratas Wistar sanas y portadoras de tumor generado por la inyección de células C6 de glioma de rata.

Método: Se utilizaron los siguientes 4 grupos de ratas Wistar machos: 1) ratas control; 2) ratas con tumor; 3) ratas control tratadas con DNAsal y papaína; y 4) ratas con tumor tratadas con DNAsal y papaína. Se administraron 125 µg/Kg de DNAsa I y 25mg/Kg de papaína por vía intravenosa en una sola dosis. Las ratas se sacrificaron para obtener la sangre total. El suero se proceso para la purificación de proteína, se analizó mediante electroforesis de proteínas en geles de poli-acrilamida con gradiente, electroforesis en geles bidimensionales y análisis mediante espectrometría de masas de los “spots” de interés.

Resultados: El tratamiento con DNAsa I y papaína indujo una proteólisis importante de las proteínas séricas, desde los 7.5 min post-tratamiento con recuperación parcial a las 24 horas y una recuperación total a las 96 horas. Se eligieron las muestras después de las 24 horas para el análisis proteómico. La comparación entre el grupo con y sin tumor, y sin tratamiento mostró 18 “spots” diferentes de los cuales se logró identificar por espectrometría de masas 8 proteínas. Cada proteína identificada en las ratas con tumor se comparó con los controles sanos, observándose la Apolipoproteína E disminuída 0.353 veces, las

Inmunoglobulinas G se redujeron 0.720 veces, el Cininógeno I disminuyó 0.564 veces, la Serpina 3 disminuyó 0.511 veces. Por otro lado, la Hemopexina aumentó 0.383 veces, Apolipoproteína A-IV aumentó 1.237, Apolipoproteína A-I aumentó 1.174 veces y la Transteritina aumentó 38.26 veces. El análisis de la comparación entre los grupos de ratas con tumor con y sin tratamiento con DNAsa I y papaína están en proceso.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que la administración sistémica (intravenosa) de DNAsa I y papaína en una sola dosis es tolerada y produce una proteólisis de las proteínas séricas. El análisis proteómico de las ratas con y sin tumor demostró que en el suero de las ratas con tumor la Apolipoproteína E, Inmunoglobulinas G, Cininógeno I y Serpina 3 disminuyen mientras que la Hemopexina, Apolipoproteína A-IV, Apolipoproteína A-I y la Transtiretina aumentan. El análisis proteómico del efecto de la DNAsa I y papaína en las ratas con tumor aun está en proceso por lo que no podemos concluir sobre el efecto del tratamiento sobre el proteoma.

Abstract

Background: Several evidences indicate that circulating DNA has transforming activities and that is able to induce tumor progression *in vivo*. However, it is not very well understood many aspects of the mechanisms of how circulating DNA transform. On the other hand, it has been demonstrated that this DNA is not “naked” but associated with protein complexes; in fact, the ability to transform and to induce tumor progression could be inhibited only by the combined use of DNAses and Proteases. It is not known if proteases can inhibit the transformation process by facilitating the DNA degradation or, if this degradation results on anti tumoral changes in the cell proteome.

Objetive: To investigate the changes in the serum proteome that results from the intravenous treatment with DNase I and the Papain protease in healthy and C6 glioma tumor bearing Wistar rats

Methods: Male rats (Wistar) were divided in four groups: 1) control group, 2) tumor bearing rats, 3) Control rats treated with DNase I and Papain and 4) tumor bearing rats treated with DNase I and Papain. The treatment consisted on a single intravenous injection of 125 µg/Kg DNase I and 25 mg/Kg papain. Rats were sacrificed and blood drained at different times. The obtained serum were processed to purify the total content of proteins which were subjected to gradient poli-acrilamide gel electrophoresis, two dimension electrophoresis and mass spectrometry analysis of relevant spots (identified at the two dimension electrophoresis).

Results: The treatment induced an important proteolysis of serum proteins as early as 7.5 min post treatment. Partial and total recoveries of these proteins were observed at 24 hrs and 96 hrs after treatment respectively. For the proteomic analysis we selected the samples obtained 24 hrs post treatment. The two dimension electrophoresis showed 18 spots differentially expressed between the

control and the tumor bearing rats. The mass spectrometry analysis identified 8 proteins; when we compared tumor bearing with control rats, we found that the following proteins were down expressed: apolipoprotein E 0.353 fold, immunoglobulin G 0.720 fold, kininogen I 0.564 fold and serpin 3 0.511 fold. On the other hand, the following proteins were up regulated: hemopexin 0.383 fold, apolipoprotein A-IV 1.237 fold, apolipoprotein A-I 1.174 fold and transtretin were increased 38.26 fold. The comparative analysis of treated tumor bearing and treated control rats is currently in process.

Conclusions: The present work demonstrates that the intravenous administration of DNase I and Papain in a single dose is well tolerated and produces the proteolysis of serum proteins. The proteomic analysis of the serum of rats with or without tumor demonstrated the reduction of Apolipoprotein E, Immunoglobulin G, Kininogen I and Serpin 3 and the increment of Hemopexin, Apolipoprotein A-IV, Apolipoprotein A-I and Transtretin in tumor bearing rats. Because the proteomic analysis of rats treated with DNase I and papain is still in progress, we cannot conclude on the effect of the treatment on the serum proteome.

Introducción

El cáncer es una enfermedad compleja y heterogénea, donde las células alteradas generan sus propios factores de crecimiento, inhiben señales que detienen la proliferación celular, evaden la apoptosis, generan angiogénesis, tienen una tasa elevada de replicación celular e invaden otros tejidos, originando lo que se le conoce como metástasis, produciendo tumores secundarios anatómicamente distantes¹. Hasta hace algunas décadas se pensaba que la progresión del cáncer ocurría únicamente de forma vertical²; sin embargo, en los últimos años se ha sugerido que la progresión de la condición maligna del cáncer proviene, también, de la transmisión horizontal de genes y se propone que el DNA que se encuentra en circulación tiene un papel fundamental en este proceso^{3, 4}.

Trabajos como los de García-Olmo y cols⁴ demostraron en experimentos *in vitro* e *in vivo* que el DNA circulante derivado de células de tumor, transforma células inmortalizadas; planteando que la metástasis se puede desarrollar como resultado de la transformación de células susceptibles, a distancia, en órganos blanco con oncogenes dominantes presentes en el DNA circulante, derivado de los tumores primarios y proponen el término de genometástasis para este proceso^{4, 5}. Por otro lado, Trejo-Becerril y cols.³ confirmaron lo propuesto por García-Olmo, al mostrar que células que son expuestas al sobrenadante de pacientes con cáncer de colon (transfección pasiva) se transforman, demostrando, demuestran que el DNA circulante participa en la progresión tumoral (**Figura 1**).

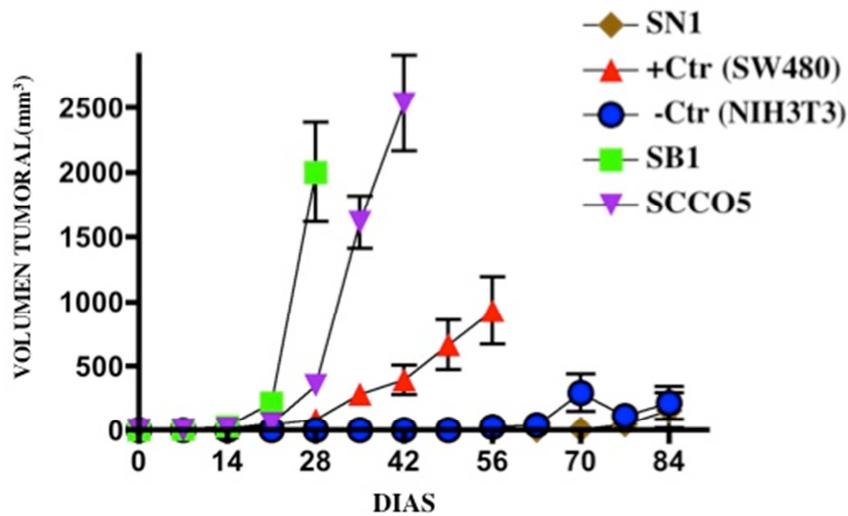


Figura 1. Tumorigénesis y transformación de células murinas después de la transfección pasiva. El crecimiento del tumor en ratones desnudos de células transformadas fue más rápido y más evidente en SB1 (NIH3T3, fibroblastos de ratón, expuestas al sobrenadante de SW480, células de cáncer de colon humano) y CCPS (células NIH3T3 expuestas a suero de pacientes con cáncer de colon). NS, células sin transfección; +Ctr, SW480; -Ctr células expuestas a sobrenadante de individuos sanos³.

DNA circulante

Mandel y Métails en 1948 reportaron la presencia de ácidos nucleicos libres en plasma⁶. Desde entonces, se ha demostrado la presencia de DNA circulante en el sobrenadante de células en cultivo, en orina, en líquido cefalorraquídeo⁷, en plasma/suero de pacientes con enfermedades como lupus eritematoso, artritis reumatoide, glomerulonefritis, pancreatitis, coledocistitis, enfermedad inflamatoria de los intestinos, úlceras pépticas, hepatitis y esofagitis; así como en el plasma/suero de individuos sanos⁸⁻¹¹.

El estudio del DNA circulante ha sido de gran utilidad clínica para la detección y diagnóstico de patologías de herencia mendeliana, en la determinación del sexo y del síndrome de Down durante la gestación^{7, 12}, en la determinación de daño causado durante un trauma, en enfermedades autoinmunes y como marcador molecular para varios tipos de cáncer: para cáncer de mama (mutaciones en p53, ERB2, la presencia de los genes BRCA1, BRCA2, PTEN)^{13, 14}, de pulmón (metilación en las islas CpG, mutación en EGFR y KRAS)¹⁵, de próstata (alteración en microsatélites, pérdida de heterocigocidad y

metilación en las islas CpG), de ovario, de colon y el hepático (alteración en microsatélites y pérdida de heterocigocidad)^{14, 16, 17}.

Se ha observado que las concentraciones de DNA circulante aumentan en el suero de pacientes con traumas¹⁸ y tumores^{14, 19}, en comparación con el suero de donadores sanos. En pacientes con cáncer se han detectado un promedio de 180 ng/ml mientras que en individuos sanos es de 13 ng/ml^{20, 21}; se ha reportado que el DNA circulante comparte características con el DNA de las células del tumor del que se origina, como es la presencia de oncogenes¹⁷, alteración en microsatélites¹⁹ e hipermetilación de varios genes¹⁴.

Se ha propuesto que una parte del DNA circulante proviene de dos procesos celulares, apoptosis y necrosis²²; por otro lado Rogers y cols. reportaron que la activación de linfocitos humanos con fitohemaglutinina (PHA) produce que dupliquen selectivamente una porción limitada de su genoma, la cual es secretada y detectadas en el medio de cultivo, originándose a partir de un proceso activo^{23, 24}. Así mismo, el grupo de investigación de Antonyac y cols. sugiere que existe una liberación espontánea por medio de la generación de micro vesículas y ello depende de la estirpe celular^{25, 26}. Se sugiere que el DNA circulante se encuentra en forma de nucleosomas, asociado con lípidos y/o proteínas, o bien formando un complejo de DNA/RNA y lipoproteínas denominado "virtosoma"^{3, 7, 22, 27}.

El mecanismo mediante el cual el DNA circulante penetra en las células es controversial, ya que algunos autores sugieren que el complejo DNA circulante/proteínas se transloca a través de la membrana, mediante un proceso que no involucra endocitosis y que no requiere de la utilización de energía. Otros proponen la activación de la vía de señalización del receptor Toll, o bien la presencia de una proteína asociada con membrana donde se une el DNA denominada proteína MNAB²⁷⁻²⁹.

Enzimas como terapia para el cáncer

En los últimos años se ha incrementado el uso de enzimas, debido a la alta afinidad y especificidad de sustratos, lo que las hace buenas candidatas para el

tratamiento de desórdenes, entre ellos el cáncer³⁰. Las DNAsas^{31, 33} y algunas proteasas^{34, 35} son enzimas que tienen un papel fundamental en procesos celulares, por lo cual podrían ser utilizadas como agentes antitumorales³⁶.

DNAsa I

La DNAsa I, es una endonucleasa específica que hidroliza DNA de doble cadena, generando tri-oligonucleótidos y tetra-oligonucleótidos, su actividad enzimática óptima es alrededor de un pH de 7.5, y tiene una masa molecular aproximada de 31-34 kDa. Mediante análisis estructurales de rayos X se ha demostrado que tiene preferencia por los enlaces fosfato del surco menor de la cadena de DNA y, de esta manera, altera la geometría de la conformación de la estructura del B-DNA³⁷. La DNAsa I se considera una enzima digestiva, ya que se encuentra principalmente, en órganos asociados con el sistema digestivo, tales como el páncreas y/o las glándulas parótidas, y se secreta en el tracto digestivo para hidrolizar DNA exógeno. Participa en los procesos de reparación, replicación y degradación del DNA durante el ciclo celular y en la apoptosis³⁸. En células tumorales, la actividad y la concentración de la DNAsa I se ve alterada. Sin embargo, el efecto de DNAsa I exógena en células de cáncer humanas ha sido poco estudiada; a pesar de que en cultivo reduce la proliferación de células tumorales³⁹. En modelos animales se ha demostrado que la DNAsa I disminuye el tamaño de nódulos linfáticos en ratones con leucemia linfática espontánea; así mismo inhibe el desarrollo tumoral y la formación de metástasis en diversos modelos murinos con carcinoma de Lewis, con hepatomas^{40, 41} o en ratones inoculados con células de cáncer de colón humano³.

Otros autores han demostrado que la DNAsa I es capaz de evitar el crecimiento tumoral y prevenir la metástasis cuando se aplica en dosis bajas³¹. Por lo que la aplicación de esta enzima inhibe el crecimiento metastásico así como una regresión significativa del tumor primario^{40, 41}.

Proteasas

Las proteasas son enzimas cuya función es hidrolizar enlaces peptídicos, se dividen según el enlace peptídico que rompen en exopeptidasas y endopeptidasas. De acuerdo con su mecanismo catalítico se dividen en aspartil, glutamil, cistein, serin, treonin y metaloproteinasas. Las primeras tres clases utilizan una molécula de agua como agente nucleofílico que ataca al enlace peptídico, mientras que en las siguientes, el nucleófilo es un residuo de aminoácido (cisteína, serina o treonina) ubicado en el sitio activo de la clase de donde derivan sus nombres⁴².

En suero, las proteasas exógenas preservan su actividad proteolítica y participan en la regulación y degradación de una serie de factores relacionados con la reacción inflamatoria; bajan los niveles de citosinas³⁵, degradan factores que regulan las proteínas, participan en la activación de receptores, degradan proteínas dañadas por la inflamación, facilitando su fagocitosis y eliminación por la circulación linfática y venosa, inhiben la expresión de las moléculas de adhesión (que durante el curso de enfermedades neoplásicas se expresan en la superficie de células tumorales, entre otras), inhiben la formación de complejos inmunes circulantes e incrementan, de manera importante, la absorción y la acción de los antibióticos y los quimioterapéuticos⁴².

Las células que participan en la génesis y progresión de las enfermedades neoplásicas, se comunican con otras células mediante citocinas, moléculas de adhesión, receptores de membrana y otros mediadores. Debido a que las proteasas participan en formas diferentes en todos éstos procesos, el valor de las proteasas en la terapia antitumoral puede considerarse desde muchas perspectivas^{34, 42}. Algunos autores sugieren que las cisteín-proteasas como la tripsina, la quimotripsina, la bromelina y la papaína, o la combinación de éstas, pueden ser empleadas como terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer³⁵, ya que se han administrado oralmente para reducir los efectos secundarios de la quimioterapia en cáncer de mama y colorectal¹⁶.

Sin embargo, son pocos los estudios realizados en enfermedades oncológicas en donde se empleen estas enzimas como terapia antitumoral. En modelos animales, se observó que el crecimiento de tumores se inhibe con el tratamiento aplicado por vía rectal de una mezcla de proteasas (tripsina, quimotripsina y papaína), en comparación con los tumores del grupo control; además, se redujo significativamente la invasión del tumor primario y se produce sobrevida mayor en los animales tratados^[20]. En experimentos realizados en animales inmunocomprometidos a los que se les inocularon células humanas de cáncer de mama o de páncreas, se demostró que las proteasas producen ciertos cambios moleculares y biológicos en la superficie de las células cancerosas. Entre éstos están la reducción en la expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD54 y en la expresión de p53 y de c-erb/B2⁴³. En un estudio clínico, Sakalova y cols. evaluaron el impacto de la terapia enzimática adicional a la quimioterapia en pacientes con mieloma múltiple, y observaron en suero, una disminución en la concentración de factores de crecimiento tumoral comparado con aquellos pacientes con los que únicamente recibieron la quimioterapia estándar, concluyendo que el uso de enzimas retarda la progresión del cáncer⁴³.

Papaína

Es una enzima que proviene de *Carica papaya L.*, tiene gran importancia en la industria farmacéutica por sus efectos en el tratamiento de úlceras y gangrena⁴⁴. En estudios *in vitro* realizados con células endoteliales, se observó la reducción de la proliferación y migración celular, así como el estado de fosforilación de MEK-1, involucrado en la ruta de señalización que participa en proliferación celular, lo que sugiere que la papaína puede tener efecto anti-angiogénico⁴⁵.

Modelos para el estudio del cáncer

Un modelo ideal para el estudio del cáncer, debe de ser clínicamente relevante, reproducible y representativo para la población humana. Dentro de los modelos que son utilizados para el estudio del cáncer, están los crecimientos espontáneos, los inducidos genéticamente o mediante compuestos químicos, los

singénicos y xenoinjertos; todos estos modelos tienen la finalidad de observar interacción en los sistemas biológicos, de entender la formación de metástasis a partir de los tumores primarios y observar los mecanismos de acción que los tratamientos pudieran tener al detener la progresión del cáncer, en el crecimiento y la diseminación del tumor; y que puedan prolongar la vida del paciente⁴⁶.

Modelo de C6

Uno de los modelos de cáncer que más se ha utilizado es la línea celular C6, la cual, de acuerdo con la ATCC (American Type Culture Collection), corresponde a un glioblastoma de rata *Rattus norvegicus*. El modelo singénico de C6 ha sido utilizado para analizar la generación de metástasis, ya que tiene un crecimiento rápido y genera tumores primarios a las dos semanas de ser inoculado. Se caracteriza por presentar mutaciones en p16 y CDKN2a, sobreexpresa los genes PDGF β , IGF-1, EGFR y Erb/Her3, así mismo se ha observado que tiene incrementada la expresión de Ras y Rb. Este modelo también es utilizado para evaluar la eficacia de tratamientos como la quimioterapia, la terapia anti-angiogénica, los inhibidores de proteosomas, los tratamientos con toxinas, radioterapia, la terapia fotodinámica, la terapia oncogénica viral y la terapia génica^{47, 48}.

Proteómica

El término proteoma fue introducido para describir al grupo de proteínas codificado por el genoma que se expresan en un momento fisiológico dado. A la disciplina que se encarga del análisis de estas proteínas, isoformas, modificaciones, y las interacciones entre éstas, se le conoce como proteómica⁴⁹. La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en situaciones metabólicas y/o patológicas diferentes permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con estados fisiológicos específicos⁵⁰.

Para el estudio de la proteómica, ha sido necesario el fortalecimiento definitivo de la espectrometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos. Esto, combinado con el empleo de métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como la 2D-PAGE (electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitieron consolidarla como una herramienta en extremo útil para el análisis masivo de proteínas⁵⁰.

Se ha considerado que los ensayos realizados en suero y/o plasma son los menos invasivos, infiriéndose como un acceso a las proteínas circulantes en la cual se pueden detectar algunas anomalías hasta los niveles de tejidos y órganos. Sin embargo, descifrar el proteoma de suero es un reto, debido a diversos niveles de abundancia en las proteínas y la presencia dominante de proteínas tales como la albúmina y las inmunoglobulinas, las cuales constituyen el 85 % del total de las proteínas séricas e interfieren en la identificación del resto; después de la depleción de las proteínas más abundantes, se han logrado identificar alrededor de 254 proteínas diferentes en muestras de suero humano^{51, 52}.

Electroforesis en dos dimensiones

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es la herramienta más empleada para el análisis global y separación de los componentes del proteoma. La técnica más utilizada se basa en dos propiedades físico-químicas independientes, que son el punto isoeléctrico (pI) y la masa molecular de las proteínas. La separación en la primera dimensión se realiza por isoelectroenfoque (IEF), en el que las proteínas se separan en un gradiente de pH, hasta alcanzar la posición en que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico. El gradiente de pH se forma por la presencia moléculas pequeñas llamadas inmobilinas, que se encuentran co-polimerizados en una matriz de acrilamida inmovilizada en una tira (IPG). En seguida, durante la segunda dimensión, las proteínas se separan por su masa molecular en presencia de SDS, la tira utilizada en el isoelectroenfoque se aplica de forma transversal sobre un gel de poliacrilamida. Este método nos

permite visualizar hasta 2000 proteínas “spots” o manchas de proteínas resueltas en un solo gel, mostrando un patrón característico para cada grupo de muestras (casos y controles, experimentales y testigos, etc.)⁵³. La identificación de las proteínas se realiza extrayendo directamente el “spot” de los geles para ser analizados por espectrometría de masas (MS)⁵⁴.

Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (mass spectrometry, MS, por sus siglas en inglés) se ha convertido en un herramienta poderosa para los análisis proteómicos, un espectrómetro de masas separa iones en fase gaseosa, basados en su relación masa/carga (m/z). De forma breve, un espectrómetro de masas cuenta con cuatro partes principales: una fuente de iones, un analizador de masas, un detector y un sistema de representación de datos que presenta el espectro de masas de cada molécula (**Figura 2**).

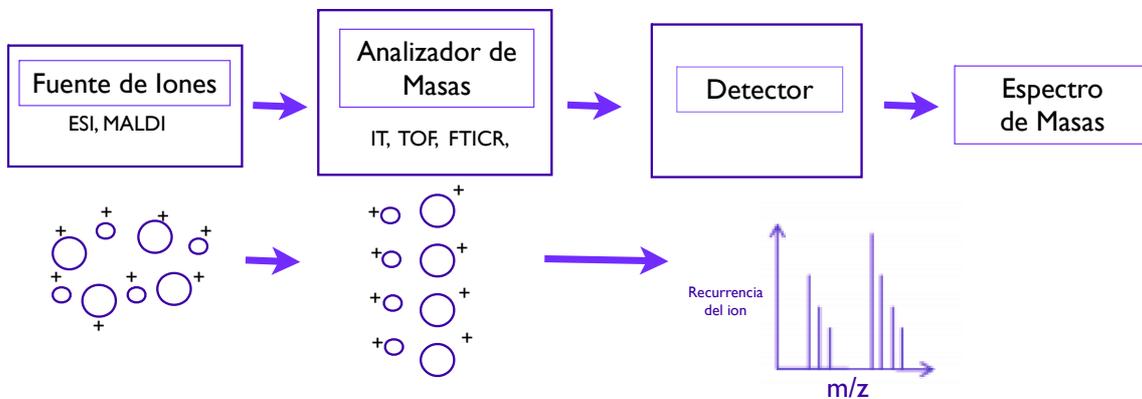


Figura 2. Esquema general de un espectrómetro de masas.

Durante la primera etapa, los analitos son ionizados y evaporados, donde la fuente de ionización más común es el electro-espray (ESI) en el cual los analitos de una solución se ionizan, y puede estar acoplado en línea con un cromatógrafo de líquidos. Por otro lado, en el sistema de desadsorción y ionización de la matriz asistida por láser (MALDI), se cristaliza la muestra en una matriz que

generalmente es un ácido orgánico, posteriormente será iluminada por un láser, vaporiza y ioniza los péptidos y las proteínas⁵⁵⁻⁵⁷. Una vez que la muestra a analizar se encuentra en la fase gaseosa los analitos se separan por su relación m/z en el analizador de masas; los iones golpean al detector y éste registra el número de iones con una relación m/z determinada⁵⁶⁻⁵⁸.

Identificación de proteínas

La identificación de proteínas se lleva a cabo en dos partes, analizando la huella peptídica de los fragmentos producidos de la proteína pura por hidrólisis con tripsina, seguida del análisis de la secuencia de algunos de los péptidos para determinar la secuencia. Los péptidos se identifican al comparar sus espectros de masa con los almacenados en bases de datos y de esta manera, se proponen los que mejor se ajustan a los datos experimentales⁵⁹. Además, con el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es posible obtener la secuencia de una proteína de *novo* a partir de su patrón de fragmentación⁶⁰.

Antecedentes

El DNA circulante asociado con proteínas es un agente transformante que incrementa el intercambio de información genética entre células eucariotas, favoreciendo la metástasis³, con esta base, el grupo de investigación del laboratorio de epigenética del Instituto Nacional de Cancerología, demostró que: i) el DNA circulante presente en el sobrenadante de líneas celulares malignas y en el suero de pacientes con cáncer, transforma células murinas inmortalizadas, esto se asoció con la transferencia horizontal de DNA; ii) La depleción del DNA circulante en el sobrenadante y en el suero, requiere del uso concomitante de DNAsa I y proteasas, ya que el DNA circulante esta protegido a ser degradado por su asociación con lipoproteínas (virtosoma); iii) la depleción del DNA circulante con DNAsa I y proteasas, elimina su capacidad transformante; iv) el número de copias de genes es casi idéntica entre el DNA intracelular (genómico) y el extracelular (circulante); v) el DNA circulante induce la progresión tumoral en un modelo de ratas inmuno-competentes las cuales fueron sometidas previamente a al carcinógeno N-dimetilhidrazina (DMH), inoculadas posteriormente con células de cáncer de colon humano en el dorso como fuente de DNA circulante oncogénico; vi) el tratamiento con DNAsa I y proteasas impide la progresión tumoral y vii) la papaína es la proteasa más eficiente para la depleción del DNA circulante, y que el tratamiento de esta proteasa, que junto con la DNAsa I tiene un efecto antitumoral en un modelo de ratones inmunodeficientes inoculados con una línea celular maligna^{3, 36}. Sin embargo, a diferencia de la DNAsa I que se sabe que no tiene efectos tóxicos en modelos animales⁴⁰, se ha observado que la Papaína produce alteraciones en el proceso de coagulación³⁶.

Justificación

Dados los efectos que tienen la Papaína y la DNAsa I sobre el DNA circulante y la disminución del volumen tumoral, se ha propuesto que ambas enzimas se utilicen como coadyuvantes antimetastásicos durante el tratamiento del cáncer³⁶. Sin embargo, la depleción del DNA circulante no ocurre de forma aislada, y se tienen muy pocos datos acerca de los efectos secundarios que podrían tener tanto la DNAsa I como la Papaína sobre otras proteínas. Es por ello que el presente trabajo pretende dilucidar cuales podrían ser los posibles efectos secundarios del tratamiento de la Papaína y la DNAsa I sobre las proteínas séricas, esto a través, de la identificación de los cambios en la composición proteica del suero después de la aplicación del tratamiento.

Pregunta de investigación

¿Qué efectos tiene el tratamiento enzimático de la Papaína y la DNAsa I en el proteoma de suero en un modelo de cáncer en rata?

Hipótesis

El proteoma del suero de ratas sanas y con cáncer es modificado al ser tratadas con la mezcla enzimática de Papaína y DNAsa I.

Objetivo General

Determinar las modificaciones que presenta el proteoma del suero de ratas con cáncer, después de aplicarles el tratamiento enzimático de Papaína y DNAsa I.

Objetivos específicos

- Analizar el proteoma del suero de ratas sanas y con cáncer mediante geles en 2D.
- Identificar las modificaciones en los proteomas anteriores por espectrometría de masas.
- Analizar las proteínas identificadas en los sueros de ratas que recibieron el tratamiento de Papaína y DNAsa I.

Material y Métodos

Se utilizaron ratas Hsd: Wistar inmunocompetentes machos de entre 400 y 600g de peso. Se Formaron 4 grupos, constituidos de 3 animales por grupo: i) Grupo control: sin tumor y sin tratamiento, ii) Grupo control: sin tumor con tratamiento, iii) Grupo con tumor con tratamiento y iv) Grupo con tumor sin tratamiento. El tumor se generó por la inoculación subdérmica de 2×10^6 células en cada flanco con la línea celular C6 de glioma de rata Wistar (ATCC), El tratamiento enzimático fue único con las siguientes dosis: papaína 25 mg/kg de peso corporal y DNAsa I 125 μ g/kg de peso. La administración del tratamiento fue a los 21 días después de la inoculación celular.

Obtención del suero

Una vez que el tratamiento fue administrado vía intravenosa, se tomaron muestras sanguínea por la misma vía en tiempos crecientes, desde los 7.5', 15', 30', 60', 6 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs y 96 hrs; en tubos sin anticoagulante. Las muestras sanguíneas se incubaron a 4°C por 1hr y posteriormente se centrifugó a 4°C a 2000 g durante 20 min. Se colectó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.45 μ m de diámetro por poro. Las muestras se almacenaron a -80°C, para los ensayos subsecuentes. Cabe señalar que no se utilizaron inhibidores de proteasas, ya que estos pueden interferir con la cuantificación del DNA en circulación.

Extracción DNA Circulante a partir de suero

Se usaron 500 μ l de suero al cual se le añadió un volumen igual de amortiguador de extracción (Tris-base 10mM, EDTA 0.02M, SDS 0.5%, pH 7.8), proteinasa K a una concentración final de 100 μ g/ml y se dejó incubar toda la noche. Posteriormente, se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo a 20°C y se mezcló hasta formar una emulsión, se agitó durante 5 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 10min a 20°C. Posteriormente se recuperó la fase superior en un tubo nuevo y para mejorar el rendimiento se agregó un volumen igual de H₂O bidestilada estéril, se mezcló y se dejó incubar a 4°C por 24hrs. Se centrifugó a

3000 rpm durante 10min a 20°C, se agregó un volumen igual de cloroformo y se mezcló hasta formar una emulsión. Se agitó por inversión durante 5 min y centrifugó a 3000 rpm por 10min a 20°C. Se separó la fase superior en un tubo.

Se continuó con la precipitación del DNA a partir de la fase recuperada, se agregó 1µl de glucógeno, acetato de amonio saturado 7.5M 1:10 v/v y 2 volúmenes de etanol al 100%, se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Tras la precipitación se centrifugó a 14,000 rpm durante 45min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar el botón. Se solubilizó en 50µl de H₂O bidestilada estéril para determinar su concentración.

Análisis Proteómico

Se hizo un “pool” de las muestras de suero por grupo, de tal manera que cada muestra aportó 900µg de proteína disueltas en un volumen final de 500µl.

Eliminación de proteínas abundantes de suero

Se utilizó una columna preparativa de inmunoafinidad para HPLC, Hu-6HC 4.6 x 100mm (Agilent). Se realizaron 4 inyecciones de 80µl cada una, a un flujo de 0.13ml/min. Se colectó la primer fracción que nos dio absorbancia a 280nm de cada una de las inyecciones para después concentrar por ultracentrifugación (Amicom) con corte de 3kDa.

Separación de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE)

Las proteínas de suero de ratas tratadas con papaína y DNAsa I fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE (30µg /carril) en geles de 7cm con una concentración de acrilamida al 12%; después de la electroforesis los geles se tiñeron con solución de tinción (azul de Coomassie 0.1%, metanol 50%, ácido acético 7%).

Separación de proteínas por Electroforesis en 2 Dimensiones (2D SDS-PAGE)

Separación de la primera dimensión: Separación por isoelectroenfoque

El suero que fue separado de las proteínas más abundantes (75µg / por tira de pH de 7cm y 400µg / tira de pH de 18cm) se colocó en amortiguador de hidratación (Urea, Thiourea, CHAPS), al cual se le agregó una solución constituida de DTT (2.5mg/7ml de amortiguador), 0.5% de anfolitos y se dejó hidratando durante 16 horas, se separó por isoelectroenfoque. Se utilizaron gradientes de pH 3-10, 4-7, 6-11 no lineales. Las tiras se colocaron durante 5 minutos en amortiguador de equilibrio con SDS, DTT como agente reductor e iodoacetamida como agente alquilante para impedir que se formen puentes disulfuro y se preparó para la segunda dimensión.

Segunda dimensión: Separación por electroforesis SDS-PAGE

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 12% de 7 cm y 18 cm, las tiras de IPG se cargaron en la parte superior de los geles y se cubrieron con agarosa al 0.5%. Los geles se tiñeron con la solución de tinción (azul de Coomassie 0.1% , metanol 50%, ácido acético 7%).

Una vez que se obtuvieron las imágenes de los geles, los “spots” más evidentes se compararon por densitometría por medio del programa Image J.

Extracción y digestión de las proteínas a partir del gel

Separación de los geles

Los “spots” se cortaron del gel y se destiñeron por dos horas en agitación constante en solución de Acetonitrilo /bicarbonato de Amonio 50mM, hasta que las piezas quedaron transparentes. Las piezas desteñidas se deshidrataron con acetonitrilo por 10 minutos y se dejaron secar en una centrífuga al vacío.

Reducción y Alquilación

A cada mancha correspondiente a una proteína se le agregó el buffer de reducción (20mM de Ditiotretitol / 50mM Bicarbonato de amonio), se incubó por una hora a 56°C y se removió el buffer. Se agregaron 100mM de iodoacetamida en 50mM de Bicarbonato de amonio. Se hicieron lavados con bicarbonato de amonio, acetonitrilo 50:50 bicarbonato de amonio 50mM y acetonitrilo al 100%. Se dejaron secar los geles en una centrifuga de vacío por 15 minutos.

Digestión de tripsina en gel

Se rehidrataron las piezas de geles en la solución de digestión con 20µg de tripsina por cada 1.5ml de 50mM de bicarbonato de amonio y se dejaron incubar a 4°C por 35 minutos. Se removió el exceso del sobrenadante y se agregó el buffer con 25mM de bicarbonato de amonio y se dejó toda la noche a 37°C.

Extracción de los péptidos

Después de la incubación de toda la noche, se colectó el sobrenadante, al cual se le agregó la solución de extracción (45 % acetonitrilo, 10% ácido fórmico) y se colectó el sobrenadante junto con el de la incubación. El extracto se evaporó hasta tener un volumen final de 10µl. Se utilizaron puntas ZipTips (Millipore) para eliminar sales y se almacenó a -20°C.

Análisis MS/MS

Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics analyzer Applied Biosystems). Se utilizó como matriz ácido alpha-cyano-4-hydroxy-trans-cinamico. Se identificaron las proteínas por MS/MS usando el software Protein Pilot 2.0, en la base de datos de *Rattus norvegicus*, colocando la variable tripsina como enzima de digestión. Las proteínas identificadas fueron clasificadas de acuerdo con su proceso biológico en la base de datos Uniprot disponible en la red.

Resultados

Modelo *in vivo*

Los animales inoculados con la línea celular C6 desarrollaron tumores subdérmicos a los 10 días de haber sido inyectados y se determinó el volumen tumoral en mm³ con la siguiente fórmula⁶¹ :

$$VM = \left(\frac{\text{diámetro mayor}}{2} \right) \left(\frac{\text{diámetro menor}}{2} \right)^2 \left(\frac{\pi}{6} \right)$$

Antes de iniciar el tratamiento enzimático los animales se parearon de acuerdo con su peso y tamaño tumoral; posteriormente, se administró por vía intravenosa el tratamiento enzimático (Papaína y la DNAsa I) tomando en cuenta el peso, por vía intravenosa (**Tabla1**).

Tabla 1. Volumen tumoral y dosis aplicadas de Papaína y DNAsal.

	Tratadas					Sin tratamiento		
	Rata num.	Peso (g)	Papaína (mg)	DNAsa I (µg)	Tamaño tumor (cm ³)	Rata num.	Peso (g)	Tamaño tumor (cm ³)
Sanas	1	425	10.62	327.67	-	1	570	-
	2	515	12.9	160	-	2	482	-
	3	462	11.55	356.2	-	3	401	-
	4	560	15	173	-	4	443	-
		Peso (g)	papaína (mg)	DNAsal (µg)	Tamaño tumor (cm ³)		peso (g)	Tamaño tumor (cm ³)
Tumor	1	594	12.1	373	1.59/1.21	1	484	1.59/8.49
	2	540	14.25	434	1.77/1.70	2	588	1.09/7.65
	3	494	12.35	380.87	9.27/7.33	3	458	6.77/4.31
	4	El tumor involucionó					4	El tumor involucionó

Una vez que se obtuvieron las muestras de suero, pasadas las 96 horas, las ratas fueron sacrificadas para obtener la sangre total mediante punción cardiaca;

además, se tomaron muestras de los tumores para realizar el estudio histopatológico de las neoplasias generadas, con la finalidad de confirmar la presencia de células tumorales. En la **Figura 3** se muestra un corte representativo del tumor, el inciso A de la figura corresponde a la periferia del tumor donde se presenta una neoplasia maligna rodeada de estroma, mientras que en el inciso B corresponde a la periferia tumoral donde se observa una neoplasia maligna rodeada de necrosis.

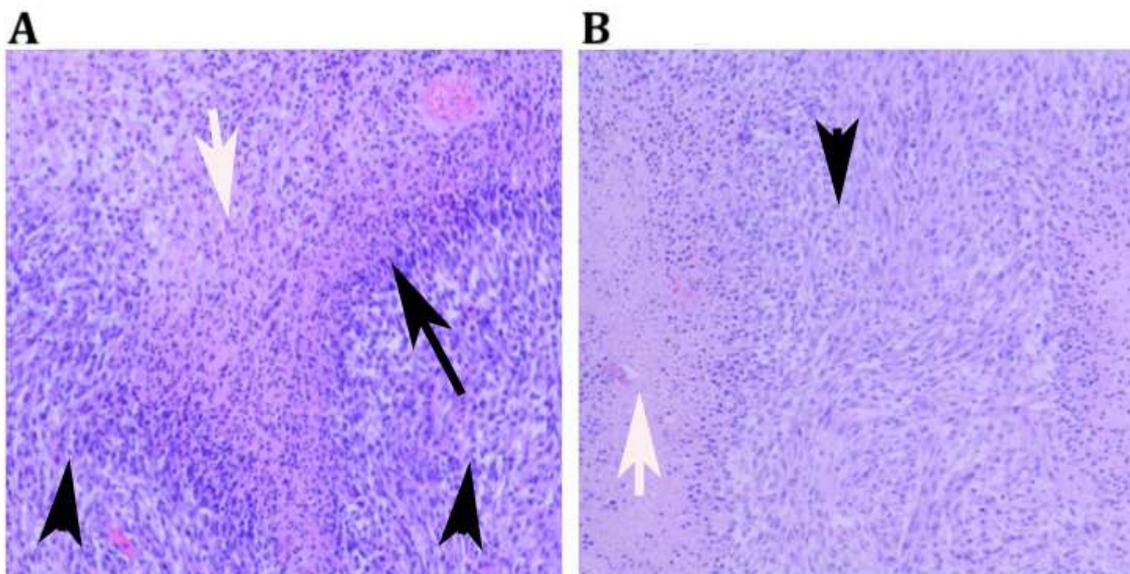


Figura 3. Corte histológico de los tumores generados por la línea celular c6. A, corresponde a la periferia del tumor, las cabezas de flecha negra son las células tumorales mientras que las flechas negras son células limítrofes en empalizada; B, corresponde al centro del tumor, indicando las mismas características que las descritas en A. Aumento 10X.

Efecto del tratamiento sobre el DNA circulante.

Se probó el efecto de la administración de la mezcla enzimática (Papaína y DNAsa I) de forma concomitante y diferida, sobre el DNA circulante en el suero de ratas. Se observó una disminución importante del DNA circulante en el suero de las ratas que fueron tratadas con la mezcla enzimática de forma diferida comparada con aquellas a las que les administró el tratamiento de forma concomitante (**Figura 4**). Por ello, se decidió realizar el análisis proteómico en el suero que proviene de ratas que recibieron el tratamiento enzimático de forma diferida.

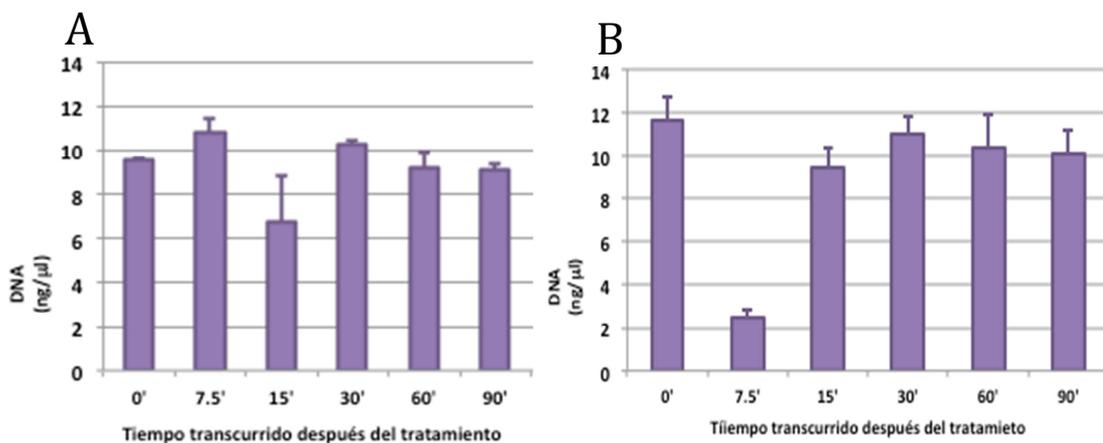


Figura 4. Concentración de DNA circulante en suero de ratas con tumor más tratamiento. A, tratamiento administrado simultáneamente; B, tratamiento administrado de forma diferida.

Efecto del tratamiento sobre las proteínas séricas *in vivo*.

Se analizó la concentración y la integridad de las proteínas séricas de las muestras colectadas tanto de las ratas sanas tratadas como de las que tenían tumor, a 7.5, 15, 30 y 60 minutos, y , 6, 24, 48, 72 y 96 hrs. Después de los 7.5 minutos se observó una disminución en las proteínas de masa molecular elevada y aumentaron las proteínas de masa molecular baja; este patrón se conserva hasta los 60 minutos, empezando a restablecerse hasta después de las 6 horas (**Figura 5**).

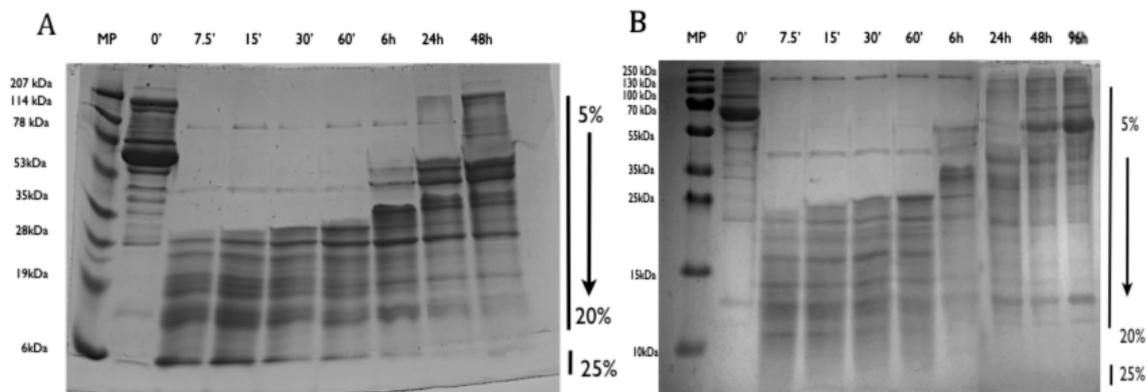


Figura 5. Geles representativos de poliacrilamida en gradiente de 5-20%, con un gel al final de 25%, donde se muestran las proteínas de suero de ratas tratadas con Papaína y DNAsa I tomadas en tiempos crecientes. A, rata sana con el tratamiento enzimático; B, rata con tumor con tratamiento enzimático.

Tomando en cuenta que la degradación casi total de las proteínas en el suero de las ratas tratadas, se decidió realizar el análisis proteómico en las muestras que fueron tomadas 24 horas después de haber administrado el tratamiento enzimático ya que existe una recuperación parcial de las proteínas.

Eliminación de las proteínas abundantes del suero

En la mayoría de los análisis proteómicos, se realiza la exclusión de las proteínas más abundantes del suero, ya que su abundancia puede interferir con la detección de proteínas que se encuentran en concentración baja. Las proteínas que se consideran de mayor abundancia en suero son la albúmina, α -1-antitripsina, ferritina, transferrina, IgG y haptaglobina; para eliminarlas se utilizaron columnas "Seppro Rat Spin Columns" (Sigma). Como se observa en la **Figura 6 A** en los carriles 2 y 3, se elimina gran parte de la proteína más abundante, la albúmina, comparada con el carril 1 que corresponde al suero completo; en el carril 4, se muestra la fracción que fue eluída con el amortiguador de elución la cual corresponde a las proteínas abundantes. Antes de reutilizar las columnas se hizo pasar un blanco con sólo solución amortiguadora; estas fracciones también fueron colectadas y se separaron en geles de acrilamida, ya que después del lavado queda una parte de las proteínas abundantes (**Figura 6 A**, carriles 5, 6 y

7). Al reutilizar las columnas para otro grupo de muestras, van perdiendo capacidad de unión, lo cual se observó en el grupo de muestras en que las columnas fueron reutilizadas ya que tuvo menos eficacia en la eliminación de las proteínas abundantes (**Figura 6 B**).

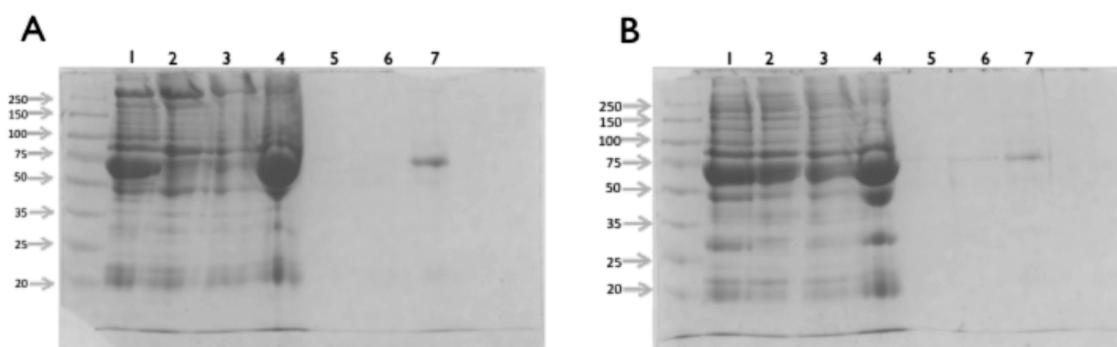


Figura 6. Geles de poliacrilamida al 10% donde se muestran las proteínas de suero de ratas sin tratamiento tras la purificación con las columnas “Seppro Rat Spin Columns”; A, suero de rata sin tratamiento; B, suero de rata con tumor sin tratamiento. Cariles: 1), suero en una dilución 1:25; 2), filtrado, corresponde a la fracción libre de albúmina; 3), lavado, corresponde a los restos después del filtrado; 4), eluído fracción que corresponde a las proteínas abundantes; 5), filtrado del blanco; 6), lavado del blanco; 7), eluído de blanco.

Dados los resultados con las columnas Seppro Rat Spin Columns (Sigma) donde se observa que existe una pérdida en la retención de las proteínas abundantes, se decidió el uso de una columna de inmuno afinidad para HPLC (Agilent H6 4.6mm x 100mm); esta columna es específica para proteínas de origen humano; sin embargo, se ha reportado que puede ser utilizada para otras especies con una eficiencia de depleción de las proteínas abundantes del 30% en el caso de la rata (*Rattus norvegicus*). Para la exclusión de las proteínas más abundantes del suero, se realizaron 4 inyecciones de 80µl por grupo de muestra, donde se tenían alrededor de 900 µg de proteína de suero en cada uno de los grupos. La cromatografía se inició con 100% de amortiguador de equilibrio (Amortiguador A Agilent) a un flujo de 0.13ml/min, después del minuto 10 se cambió a 100 % de amortiguador de elución de proteínas abundantes (Amortiguador B de Agilent) a un flujo de 1ml/min, se reequilibró la columna, haciendo pasar 2 volúmenes con el amortiguador A, en la **Tabla 2** se muestra el protocolo que se utilizó.

Tabla 2. Separación Cromatográfica con Columna de Inmunoafinidad

Tiempo minutos	Flujo	Amortiguador A %	Amortiguador B %
17.5	0.13	100	0
18	0.13	100	0
20	1	100	0
21	1	0	100
27	1	100	0
28	1	100	0

En la **Figura 7** se muestra el perfil de elución registrado a 280 nm de cada grupo de muestras, en color rojo se representa la fracción que queda libre de proteínas abundantes, esta fracción fue colectada para realizar los geles en 2D, mientras que las siguientes fracciones, las cuales están representadas en color negro, corresponden a las proteínas abundantes las cuales se liberaron al hacer el cambio en la solución amortiguadora B; estas fracciones se colectaron y analizaron en geles de SDS-PAGE al 10%; y se observó sólo la banda de albúmina en la fracción que corresponde a las proteínas abundantes (**Figura 8**, carril 2 y 4); para los dos grupos de muestras analizados; el de las ratas sin tratamiento y el de las ratas con tratamiento (**Figura 8**).

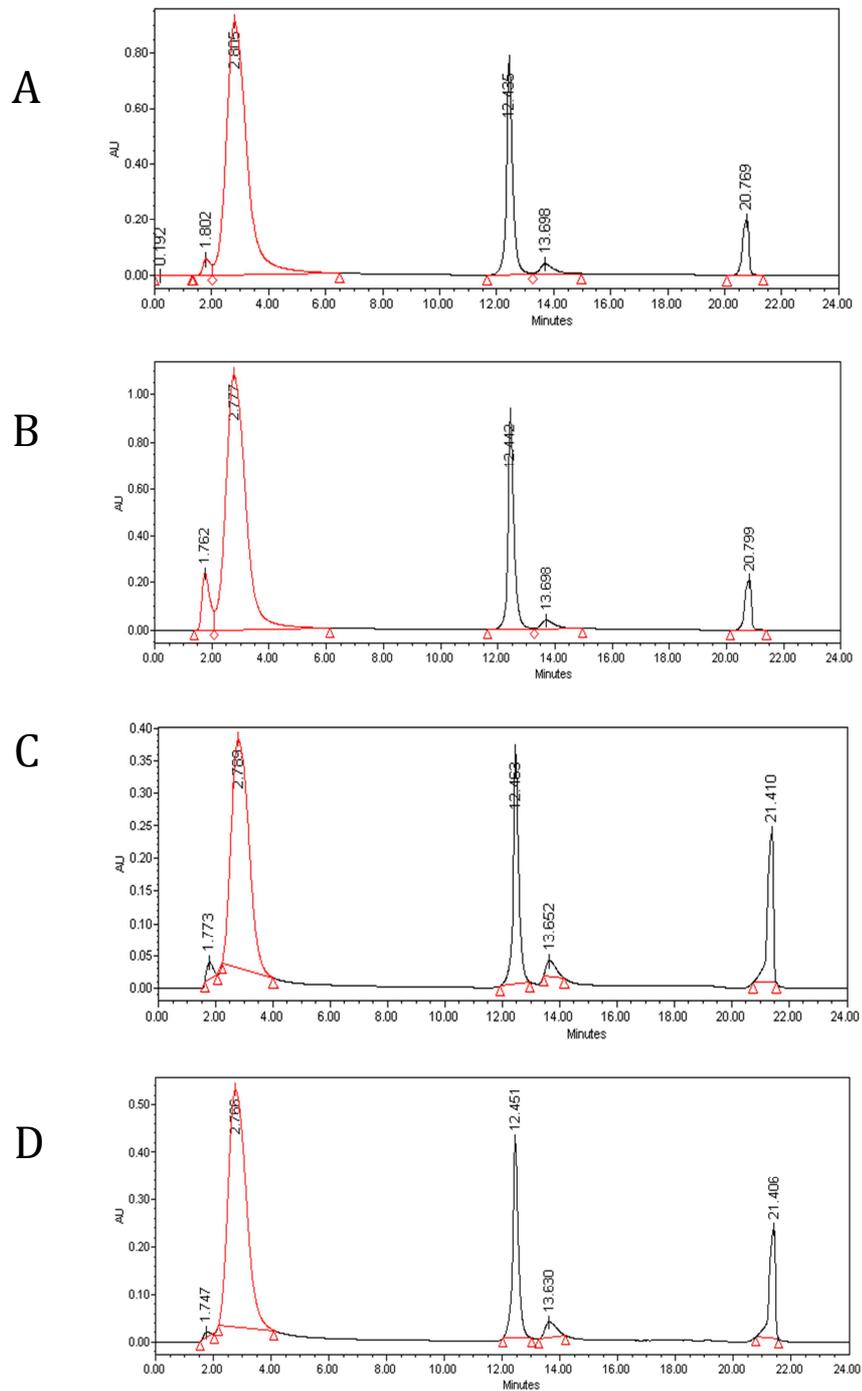


Figura 7. Perfil de elución del suero de ratas sin tratamiento monitoreadas a 280 nm . A, “pool” de suero de ratas sanas; B, “pool” de suero de ratas con tumor; C, “pool” de suero de ratas sanas 24 horas después de la administración del tratamiento; D, “pool” de suero de ratas con tumor 24 horas después del tratamiento. La fracción libre de proteínas abundantes está marcada en color rojo, mientras que la fracción con líneas negras muestra a las proteínas abundantes después de la fase de elución.

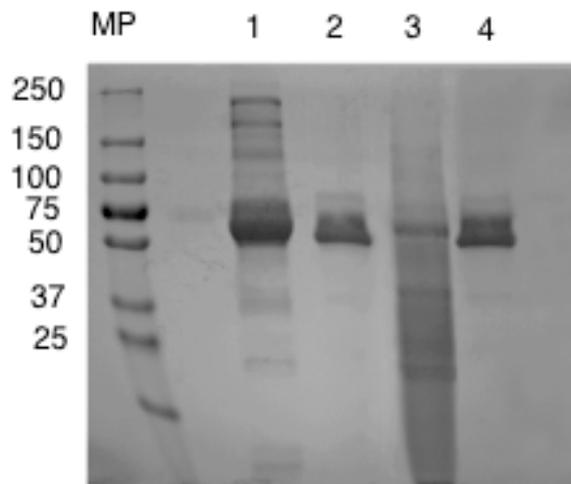


Figura 8. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra la fracción de proteínas abundantes separadas con la columna de inmunoafinidad de para HPLC (Agilent H6 4.6mm x 100mm). 1), suero de rata sin tratamiento; 2), fracción de albúmina colectada de suero de rata sin tratamiento; 3), suero de rata con tratamiento; 4), fracción de albúmina separada de suero de rata que recibió el tratamiento enzimático.

Geles 2D SDS-PAGE

Se comparó por medio de geles en 2D el suero de ratas sanas y el de ratas con tumor en geles de 7cm de longitud con un gradiente de pH de 3 a 10. En la **Figura 9**, se indican con flechas las 9 proteínas que se encontraron diferentes entre 2 los grupos. Con la finalidad de que las proteínas que tienen su punto isoeléctrico ácido se separaran mejor, se hicieron geles con un gradiente de pH de 4 a 7 (**Figura 10**). Pero como los “spots” donde se observaron diferencias eran muy pequeños, se decidió hacer geles con el mismo gradiente de pH pero de 18cm de longitud en el cual se cargaron 400µg de proteína; en este gel se marcaron con flechas los “spots” que se encontraron diferentes entre el suero de ratas sanas y el suero de ratas con tumor (**Figura 11**).

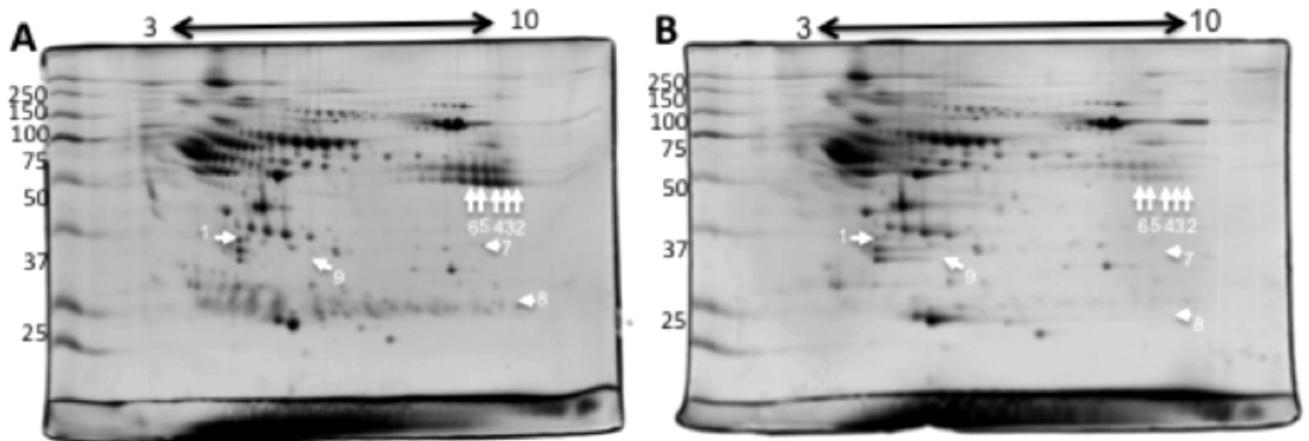


Figura 9. Geles 2D SDS-PAGE de sueros controles de 7 cm de longitud con gradiente de pH de 3-10. A, "pool" de ratas sanas; B, "pool" de ratas con tumor.

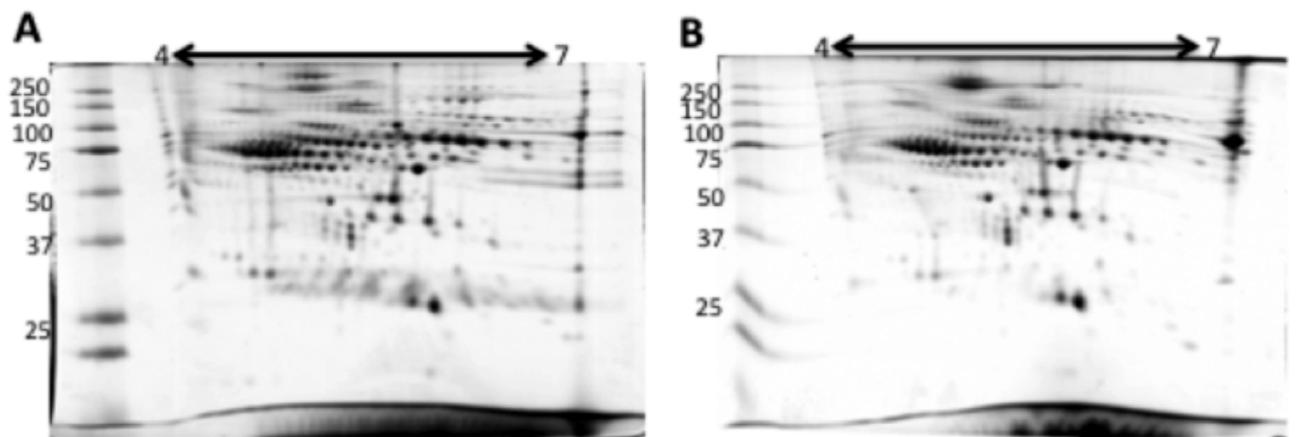


Figura 10. Geles 2D SDS-PAGE de suero de controles, de 7cm de longitud con gradiente pH de 4-7. A, "pool" de ratas sanas; B, "pool" de ratas con tumor.

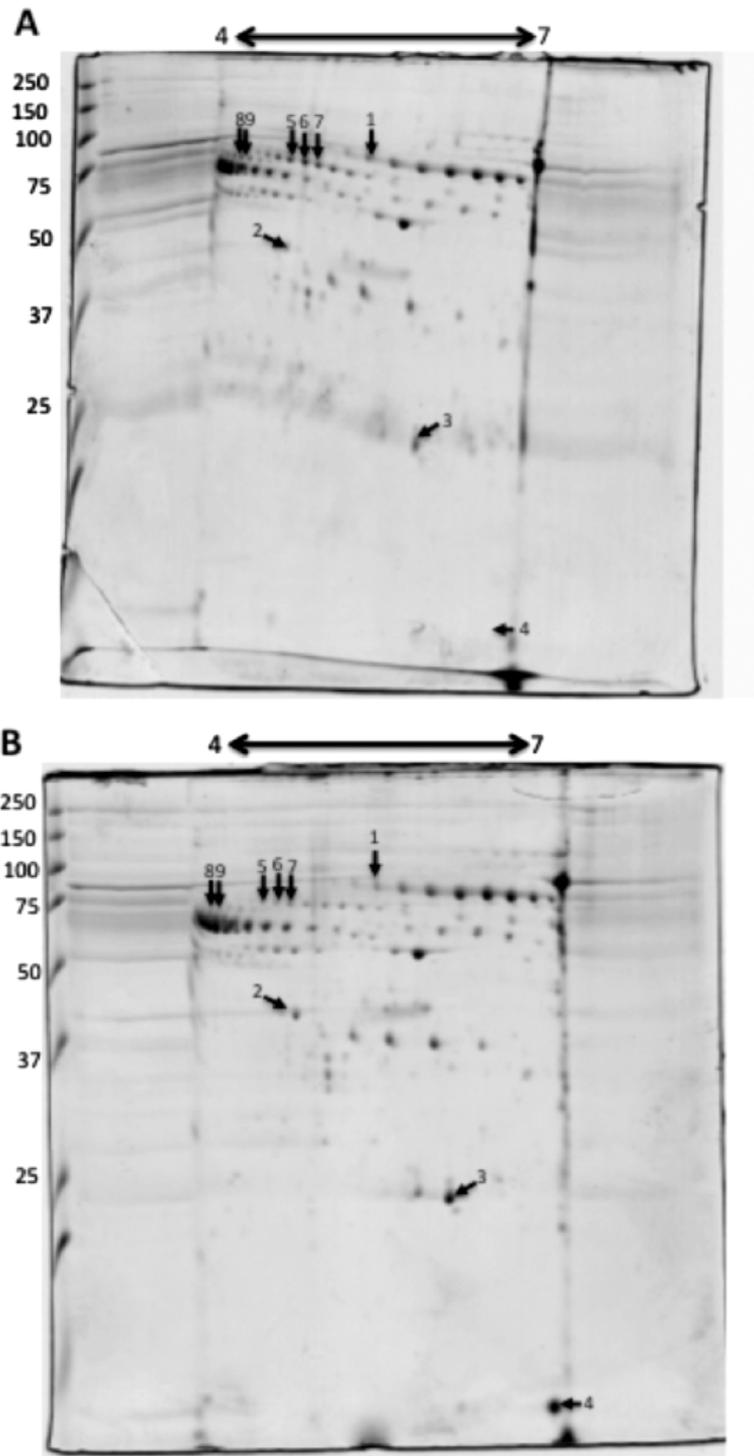


Figura 11. Geles 2D SDS-PAGE de suero de ratas control, de 18 cm de longitud con gradiente de pH de 4-7. A, "pool" de ratas sanas; B, "pool" de ratas con tumor.

Es importante mencionar que la papaína es una cistein-protesa que se caracteriza por romper enlaces peptídicos de aminoácidos básicos, que tiene preferencia por las cadenas laterales hidrofóbicas en la posición 2, y como restricción no acepta valina en la segunda posición; sin embargo, no se ha reportado si estos sitios de corte son constantes ya que no están registrados en ninguna base de datos; por éste motivo, no se ha podido realizar la búsqueda de los péptidos generados por la papaína; por lo que sólo los sueros que fueron extraídos de animales que no recibieron el tratamiento con papaína y DNAsa I, son los que se analizaron mediante geles de 2D y espectrometría de masas.

Análisis por Espectrometría de Masas de controles.

De los 9 “spots” que se observaron diferentes en los geles en 2D con un gradiente de pH de 3-10 (**Figura 9**), sólo se pudieron identificar 6; de los cuales, el “spot” marcado con el número 1 corresponde a la Apolipoproteína E y del 2 al 7 a las cadenas de IgG-2a; estos resultados se muestran en la **Tabla 3**, marcadas en color rojo.

De la misma manera se analizaron por espectrometría de masas los 9 “spots” que se encontraron diferentes en los geles de 18 cm de longitud (**Figura 11**); de éstos se identificaron los nueve, de los cuales el “spot” marcado con el número 1, corresponde a la hemopexina, el 2 a la Apolipoproteína A-IV, el 3 a la Apolipoproteína A-1, el 4 a la transtiretina, del “spot” 5 al 7 corresponden al cininógeno-1, mientras que el 8 y 9, a la Serpina 3, estos resultados se muestran en la **Tabla 4**, marcadas en color rojo.

En el anexo se muestra la impresión de pantalla de los resultados generados por el Software Protein Pilot. En donde se observa la cobertura en la secuencia de cada una de las proteínas identificadas.

Tabla 3. Resultados Espectrometría de Masas, “Spots” de la Figura 9 (ver anexo).

ID	ID Unidad	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptidos Mayor a 95
1	MS-2014-005-260	7.24	38.1	tr Q6PAH0 Q6PAH0_RAT	Apolipoprotein E OS=Rattus norvegicus GN=Apoe PE=2 SV=1	RAT	3
		0.72	1.7	tr Q9QX76 Q9QX76_RAT	Triadin 51 kDa OS=Rattus norvegicus GN=Trdn PE=2 SV=1	RAT	0
2	MS-2014-005-261	7.38	15.3	tr Q5M842 Q5M842_RAT	IgG-2a protein OS=Rattus norvegicus GN=IgG-2a PE=1 SV=1	RAT	3
3	MS-2014-005-262	8.69	23.6	tr Q5M842 Q5M842_RAT	IgG-2a protein OS=Rattus norvegicus GN=IgG-2a PE=1 SV=1	RAT	4
4	MS-2014-005-263	3.75	8.7	tr Q5M842 Q5M842_RAT	IgG-2a protein OS=Rattus norvegicus GN=IgG-2a PE=1 SV=1	RAT	2
5	MS-2014-005-264	7.62	23.6	tr Q5M842 Q5M842_RAT	IgG-2a protein OS=Rattus norvegicus GN=IgG-2a PE=1 SV=1	RAT	4
6	MS-2014-005-265	5.7	13.1	tr Q5M842 Q5M842_RAT	IgG-2a protein OS=Rattus norvegicus GN=IgG-2a PE=1 SV=1	RAT	3
7	MS-2014-005-266	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	MS-2014-005-267	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	MS-2014-005-268	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabla 4. Resultado Espectrometría de Masas “Spots” de la Figura 11 (ver anexo).

ID	ID Unidad	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptidos Mayor a 95
1	MS-2014-005-321	19.08	34.3	sp P20059 HEMO_RAT	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3	RAT	6
2	MS-2014-005-322	23.5	48.6	sp P02651 APOA4_RAT	Apolipoprotein A-IV OS=Rattus norvegicus GN=Apoa4 PE=2 SV=2	RAT	12
3	MS-2014-005-323	14.71	44.4	sp P04639 APOA1_RAT	Apolipoprotein A-I OS=Rattus norvegicus GN=Apoa1 PE=1 SV=2	RAT	7
		1.7	0.8	tr D3ZZX8 D3ZZX8_RAT	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ OS=Rattus norvegicus GN=Ptprq PE=4 SV=2	RAT	1
4	MS-2014-005-324	10.01	73.5	sp P02767 TTHY_RAT	Transthyretin OS=Rattus norvegicus GN=Ttr PE=1 SV=1	RAT	5
5	MS-2014-003-042	20.14	36.5	tr Q5PQU1 Q5PQU1_RAT	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=2 SV=1	RAT	9
		17.24	34.9	tr Q63581 Q63581_RAT	Rat T-kininogen (T-KG) OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	RAT	10
		1.1	1	sp Q9Z0U4-5 GABR1_RAT	Isoform 1D of Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gabbr1	RAT	8
6	MS-2014-003-043	24.09	46.5	tr Q5PQU1 Q5PQU1_RAT	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=2 SV=1	RAT	12
		20.59	43.5	tr Q63581 Q63581_RAT	Rat T-kininogen (T-KG) OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	RAT	10

7	MS-2014-003-044	22.14	43.3	tr Q5PQU1 Q5PQU1_RAT	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Kng1 PE=2 SV=1	RAT	10
		2.01	9.7	tr Q7TMB9 Q7TMB9_RAT	Ab1-021 OS=Rattus norvegicus GN=LOC299282 PE=2 SV=1	RAT	1
		18.68	43	tr Q63581 Q63581_RAT	Rat T-kininogen (T-KG) OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	RAT	9
8	MS-2014-003-047	22.74	60.5	tr E0A3N4 E0A3N4_RAT	Serpina3n-like protein OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1	RAT	11
		0.96	2.5	tr D4ABF6 D4ABF6_RAT	Olfactory receptor OS=Rattus norvegicus GN=Olr111 PE=3 SV=1	RAT	0
9	MS-2014-003-048	29.02	61.6	tr E0A3N4 E0A3N4_RAT	Serpina3n-like protein OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1	RAT	14

Los “spots” identificados por espectrometría de masas, se analizaron por densitometría con el programa Image j⁶²; Los datos se normalizaron para que las diferencias fueran cuantitativas. En la **Figura 12** se muestra las tendencias de las proteínas expresadas diferencialmente en el suero de ratas con tumor; mientras que en la **Tabla 5** el cambio relativo de cada una de las proteínas identificadas así como su función.

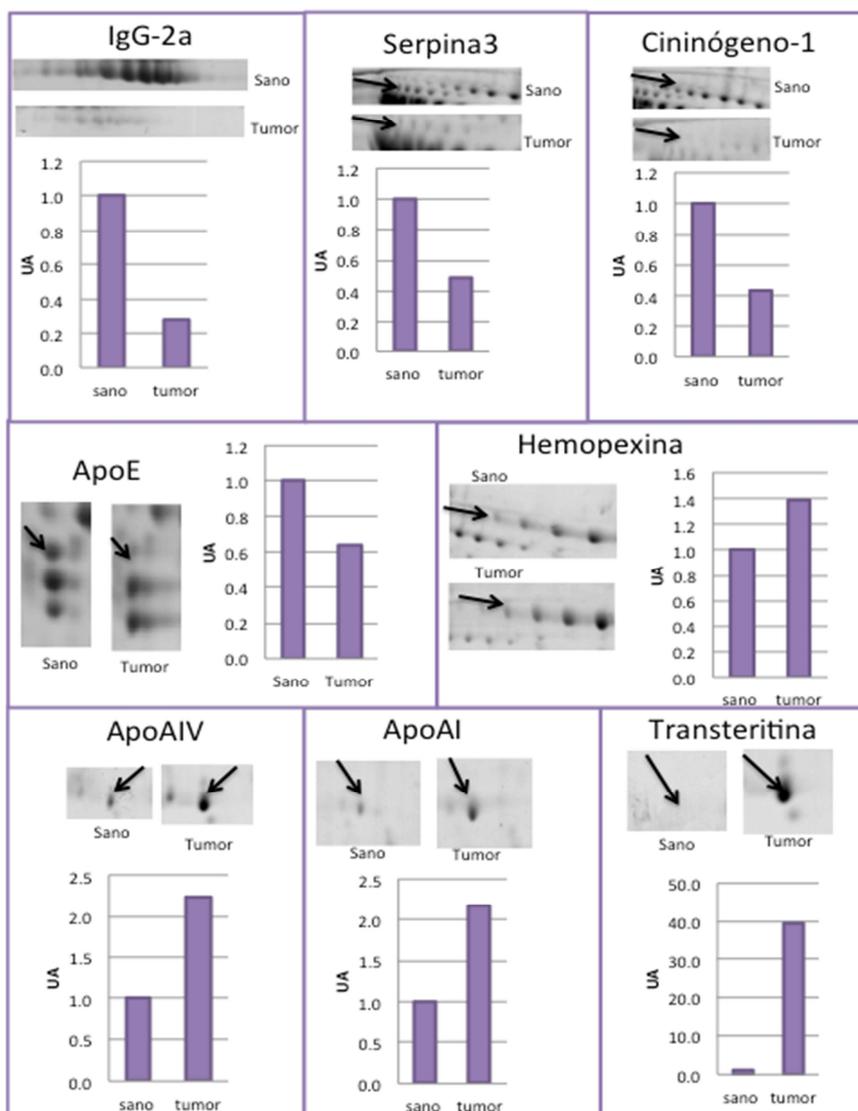


Figura 12. Diferencias entre las proteínas identificadas en el suero de ratas con tumor comparadas con las identificadas en el suero de ratas sanas.

Tabla 5. Proteínas Identificadas en Ratas con Tumor Comparadas con las identificadas en Ratas Sanas

Nombre de la proteína		Cambio Relativo	Función
Proteínas Reguladas a la baja			
1	Apolipoproteína E	.353	Metabolismo de lípidos
2	IgG-2a	.720	Antígeno / Unión a anticuerpos
3	Cinínógeno	.564	Inhibidor de proteasas
4	Serpina3	.511	Inhibidor de Proteasas
Proteínas Reguladas a la alta			
1	Hemopexina	.386	Transporte de grupo hemo
2	Transterritina	38.26	Proteína de unión / actividad de hormona.
3	Apo AI	1.174	Metabolismo y transporte de lípidos
4	Apo AIV	1.237	Actividad antioxidante, unión de lípidos/ metabolismo y transporte de lípidos.

Geles en 2D de sueros tratados con Papaína y DNAsal

En la **Figura 5** se observa que la administración del tratamiento enzimático, degrada a las proteínas de suero, por ello se consideró importante el análisis del suero 24 horas después de la administración del tratamiento; sin embargo, tuvimos problemas técnicos para continuar con el análisis experimental; es por ello que sólo presentamos el análisis completo de las diferencias entre las ratas sanas y las ratas con tumor.

Discusión

Resultados previos en el laboratorio se demostró, en un modelo *in vivo*, que el DNA circulante es capaz de favorecer la progresión tumoral aumentando el número de células cancerosas que ya fueron iniciadas mediante un carcinógeno; así mismo, esta demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que el tratamiento enzimático con DNAsa I y proteasas elimina la capacidad transformante del DNA circulante e impide la progresión tumoral en un modelo *in vivo*. Lo que ha sido corroborado, por que también se ha observado que el tratamiento sistémico con éstas enzimas tiene un efecto antitumoral en un modelo de cáncer de colon en ratones inmunodeficientes. Finalmente, el DNA circulante presente en el suero humano y en el sobrenadante de la línea celular SW480, se ha encontrado asociado con macromoléculas como proteínas ya que, para eliminarlo del suero o del sobrenadante, se necesita la administración diferida de proteasas y DNAsa I.³

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar las modificaciones que presenta el proteoma del suero de ratas con cáncer, después de aplicarles el tratamiento enzimático de papaína más DNAsa I. Inicialmente se realizó un análisis comparativo del proteoma del suero de ratas sanas comparado con el suero de ratas con cáncer mediante geles en 2D. Posteriormente, se identificaron estas modificaciones por medio de la espectrometría de masas. Una vez que se obtuvieron éstos datos proteicos, se procedió a analizar las proteínas en los sueros de las ratas que recibieron el tratamiento de papaína y DNAsa I.

En los últimos años la proteómica ha contribuido significativamente en estudios contra el cáncer, dado que, hace posible la identificación de marcadores moleculares probables que podrían servir como blancos terapéuticos, y/o como marcadores pronósticos , ya que permite un análisis completo de las proteínas que está secretando el tumor así como de la respuesta del huésped a un tratamiento determinado⁶³.

En un inicio, se había planteado realizar el análisis proteómico llevando a cabo la metodología de MudPit por sus siglas en inglés (Multidimensional Protein

Identification Technology), el cual nos permite el análisis y la identificación eficiente de proteínas en muestras complejas; sin embargo, en nuestro trabajo se tuvo la limitante en cuanto a la cuantificación e identificación de los péptidos que son generados por la papaína, ya que previo al análisis, se realiza una digestión con otra proteasa, la tripsina, por lo que se decidió utilizar la metodología tradicional de los geles en 2D, ya que ésta técnica ofrece la ventaja de hacer evidentes las diferencias entre casos y controles ⁵⁸.

El modelo *in vivo* que se utilizó para llevar a cabo el presente estudio, fue el modelo de carcinogénesis con la línea celular de rata Wistar C6. Sin embargo, éste modelo se debe de tomar con ciertas limitantes, ya que se ha reportado que ésta línea celular genera tumores a las 3 semanas de inoculación, pero hay reportes de regresión ó involución tumoral en un 66% de la población⁶⁴. En nuestro caso, sólo tuvimos regresión tumoral de un 25% de la población, además que las muestras sanguíneas para la obtención de suero en las ratas donde no observamos regresión tumoral, se tomaron antes de llegar al punto de regresión, por lo que consideramos que fue un modelo confiable para los objetivos planteados (Ver **Tabla 1**).

Al comparar por medio de geles en 2D el suero de ratas sanas con el de las ratas con tumor, observamos que si hubo modificaciones importantes en el perfil proteómico, identificándose algunas de las proteínas con alteraciones importantes por espectrometría de masas. Se identificaron 4 proteínas con mayor abundancia (Apolipoproteína A1, Apolipoproteína A IV, Transtiretina y Hemopexina) y 4 con menor abundancia (IGg2, Apolipoproteína E, Cininógeno-1 y Serpina 3) en las ratas con tumor comparadas con las ratas sanas (**Tabla 5**). Estas proteínas presentan las siguientes características:

La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína glicosilada cuya función principal es el transporte de lípidos; se asocia con enfermedades neurodegenerativas modulando la respuesta inflamatoria^{65, 66}. Se ha reportado que la activación clásica de macrófagos por citosinas inflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α disminuye de 2 a 5 veces la producción de Apo E⁶⁷. El grupo de

investigación de Yue y cols. proponen que, al liberarse TNF- α , se activa la unión de NFkB al sitio de unión del promotor de p50, disminuyendo la unión de p65 y sp1 que es la región promotora de Apo E. Se sabe que el microambiente tumoral contiene macrófagos, neutrófilos, mastocitos, natural killers (NK), linfocitos B y T; es decir, células capaces de liberar citosinas⁶⁸ razón por la que, probablemente, Apo E se disminuye hasta en un 35% en las ratas que generaron tumores.

La T-cininogeno-1 (KNG-1), también conocida como inhibidor de α -2-tiol proteasa, es una glicoproteína de plasma. Se ha reportado que la expresión de esta proteína es menor en pacientes con cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama y dos tipos histológicos de cáncer cérvico-uterino. El KNG-1 es conocido por sus propiedades anti-angiogénicas e inhibe la proliferación de células endoteliales; en nuestro estudio encontramos una disminución del 56.4% de esta proteína en el suero de ratas con tumor comparado con el suero de ratas sanas; aún no es claro el papel que tiene la KNG-1 en el proceso de carcinogénesis, sin embargo se tiene la teoría que la expresión baja de esta proteína en suero y/o plasma contribuye a la sobrevivencia de células tumorales, lo que concuerda con nuestros resultados y lo reportado en la literatura⁶⁹⁻⁷².

La serpina3, pertenece a la familia de inhibidores de serin-proteasas, es también conocida como α -1-antiquimotripsina; se ha reportado que aumenta en torrente sanguíneo en respuesta a procesos inflamatorios; se sintetiza, principalmente en los hepatocitos, células del epitelio bronquial, próstata y cerebro. Se ha observado que los niveles de esta proteína en el tejido de pacientes con cáncer de colon disminuyen en comparación con donadores sanos; sin embargo, no han encontrado estas diferencias reflejadas en circulación⁷³. A pesar de ser una proteína que se expresa en cerebro, nosotros encontramos una disminución casi del 50% de la Serpina 3 en el suero de ratas con tumor. Esta familia de proteasas, tiene un papel fundamental en la remodelación de tejidos, y algunos autores las han considerado como probables supresores de tumores⁷⁴, razón por la cual probablemente la encontramos disminuida en el suero de ratas

con tumor. Cabe resaltar que contrario a reportes anteriores, en nuestro modelo identificamos diferencias de la serpina3 en suero.

La hemopexina (HPX) es una glicoproteína de plasma que tiene actividad serin-proteasa, actividad pro-inflamatoria⁷⁵, inhibe adhesión celular y posee la capacidad de unirse a metales bivalentes. Es sintetizada en hígado después de un proceso inflamatorio y se expresa en sistema nervioso central y nervios periféricos. Para tener una inducción máxima de la HPX, se requiere de la presencia de IL-1 e IL-6. En cultivo celular de linfocitos T, estimula la proliferación celular por la vía de PKC.⁷⁶ Nuestros resultados muestran que la HPX está en mayor concentración en el suero de animales con tumor; probablemente debido a la presencia de citosinas pro-inflamatorias que son liberadas en un microambiente tumoral. Así mismo, se ha reportado que dosis bajas de IL-2 induce un incremento de la activación de células NK, el incremento de estas células está asociado con las concentraciones bajas de IgG2 en suero⁷⁷, lo cual coincide con nuestros resultados; además de que se tienen reportes de que en Glioblastoma multiforme hay una inhibición de linfocitos B ⁷⁸.

Por otro lado, hay reportes contradictorios con respecto a las otras proteínas identificadas; tal es el caso de la Apolipoproteína A I (Apo A-I) que es una de las proteínas mayoritarias en cerebro y sistema nervioso central, producida principalmente por astrocitos, Apo A-I está involucrada en el transporte de colesterol y su regulación, además con procesos inflamatorios⁷⁹. Se ha observado que hay un incremento de Apo A-I en el fluido cerebroespinal después de un daño cerebral⁸⁰; además, su concentración disminuye en suero de pacientes con cáncer de ovario⁶⁰, cáncer gástrico⁸¹; mientras que en cáncer de vejiga se encuentra en mayor concentración comparado con muestras de donadores sanos⁸²; lo que coincide con nuestros resultados ya que encontramos una concentración mayor de esta proteína en el suero de las ratas con tumor.

La Apolipoproteína A IV (Apo A-IV), tiene un efecto anti-inflamatorio, antioxidante y regula la ingesta de nutrientes⁷⁵. Se ha observado que la deficiencia de Apo A-IV en ratones transgénicos, acelera la pérdida de neuronas⁸³. Al igual

que Apo A-I, la Apo A-IV se ha utilizado como marcador molecular para cáncer de ovario⁶⁰. Tomando en consideración que los tumores generados en nuestro modelo son de origen neuronal y que Apo A-1 y Apo A-IV son secretadas principalmente por SNC, esto podría ser el argumento por el cual encontramos estas proteínas en mayor concentración en el suero de ratas con tumor, ya que las células tumorales podrían estar secretando estas proteínas al torrente sanguíneo.

La Transtiretina (TTR) es una proteína de suero también conocida como pre-albúmina; se sintetiza principalmente en el hígado, en la retina y en el plexo coroideo; su función principal como tetrámero en plasma es el transporte de hormonas tiroideas y retinol. Se ha demostrado su presencia en jugo pancreático en pacientes con cáncer de páncreas⁸⁴; así mismo los bajos niveles en suero se ha utilizado como marcador molecular para cáncer de pulmón y de ovario⁶⁰. Aún se desconoce el mecanismo por el cual bajan los niveles de TTR en suero en pacientes con cáncer; sin embargo, Ding y cols. proponen que la disminución de los niveles de esta proteína en suero pudieran deberse a una disfunción en el hígado⁸⁵. En nuestro modelo encontramos a la TTR en mayor concentración en el suero de ratas que desarrollaron tumor contrario a lo que esta reportado; pero, ya que el origen del tumor generado en nuestro modelo es neuronal, esta proteína pudiera estar siendo secretada por éstas células debido a que esta proteína es producida en el plexo coroideo.

Gollapalli y cols. realizaron un estudio en suero de pacientes con glioblastoma multiforme donde identificaron por medio de geles en 2D algunas de las proteínas que nosotros encontramos con las misma tendencias; tal es el caso de las IgG que están reguladas a la baja en el caso de las muestras de tumor, Apo A-IV y la TTR, las cuales están reguladas a la alta ⁸⁶.

Las proteínas que estamos observando son las que están siendo secretadas por el tumor hacia el torrente sanguíneo, lo que algunos autores consideran el secretoma, es importante mencionar que no hay reportes previos del secretoma en algún modelo similar en rata, por lo que nuestros resultados son un importante aporte.

Cabe señalar que está pendiente el análisis de las muestras de suero de los animales que fueron tratados con papaína y DNAsal, para poder determinar de que manera nuestro tratamiento modifica el patrón proteico del suero de ratas y si este hecho esta relacionado con la reducción del volumen tumoral.

Conclusiones

1. Se encontraron diferencias en los geles en 2D del suero de ratas sanas con el suero de ratas con tumor.
2. Se identificaron 8 proteínas con abundancia diferente en el suero de ratas con tumor comparada con el suero de ratas control.
3. Hubo diferencias en el patrón proteico de los geles SDS- PAGE en el suero de las ratas que recibieron el tratamiento comparado con aquellas que no recibieron el tratamiento.

Perspectivas

- Analizar por espectrometría de masas las proteínas encontradas en las muestras tratadas.
- Buscar la función de estas proteínas y corroborar si éstas tienen un papel importante en la progresión tumoral.
- Validar por western blot las proteínas identificadas como marcadores moleculares para nuestro modelo.
- Las proteínas que fueron identificadas podrían ser utilizadas como marcadores moleculares para el modelo de glioblastoma subdérmico en rata.

Referencias

1. Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E. and Hall, D.M., *Molecular interactions in cancer cell metastasis*. Acta Histochem, 2010. **112**(1): p. 3-25.
2. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Anker, P., et al., *Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52754.
4. Garcia-Olmo, D.C., Dominguez, C., Garcia-Arranz, M., Anker, P., et al., *Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 560-567.
5. Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D.C., Ontanon, J., Martinez, E. and Vallejo, M., *Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis*. Histol Histopathol, 1999. **14**(4): p. 1159-1164.
6. Mendel, P., Mandel, L. and et al., [Not Available]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1948. **226**(24): p. 2019-2021.
7. Peters, D.L. and Pretorius, P.J., *Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour*. Clin Chim Acta, 2011. **412**(11-12): p. 806-811.
8. Tan, A., Schur, P. and Kunkel, H., *Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus*. J. Clin Invest, 1966. **45**: p. 1732-1740.
9. Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R. and Kunkel, H.G., *The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases*. J Clin Invest, 1973. **52**(1): p. 198-204.
10. Steinman, C.R., *Free DNA in serum and plasma from normal adults*. J Clin Invest, 1975. **56**(2): p. 512-515.
11. Li, J.Z. and Steinman, C.R., *Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(6): p. 726-733.
12. Swarup, V. and Rajeswari, M.R., *Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases*. FEBS Lett, 2007. **581**(5): p. 795-799.
13. Beck, J., Urnovitz, H.B., Mitchell, W.M. and Schutz, E., *Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(3): p. 335-342.
14. Wu, T.L., Zhang, D., Chia, J.H., Tsao, K., et al., *Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range*. Clin Chim Acta, 2002. **321**(1-2): p. 77-87.
15. Gautschi, O., Bigosch, C., Huegli, B., Jermann, M., et al., *Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy*. J Clin Oncol, 2004. **22**(20): p. 4157-4164.
16. Leipner, J. and Saller, R., *Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action*. Drugs, 2000. **59**(4): p. 769-780.
17. Schwarzenbach, H., Hoon, D. and Pantel, K., *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. Nature Reviews, 2011. **11**: p. 426-437.

18. Laktionov, P.P., Tamkovich, S.N., Rykova, E.Y., Bryzgunova, O.E., *et al.*, *Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004. **23**(6-7): p. 879-883.
19. Suzuki, N., Kamataki, A., Yamaki, J. and Homma, Y., *Characterization of circulating DNA in healthy human plasma*. *Clin Chim Acta*, 2008. **387**(1-2): p. 55-58.
20. Macho, E.D., *Plasma DNA levels as a tumor marker in primary lung cancer*. *Jap j Thoracis Dix*, 1990. **28**: p. 1085-1091.
21. Fournie, G.J., Courtin, J.P., Laval, F., Chale, J.J., *et al.*, *Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours*. *Cancer Lett*, 1995. **91**(2): p. 221-227.
22. Mitra, I., Nair, N.K. and Mishra, P.K., *Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host?* *J Biosci*, 2012. **37**(2): p. 301-312.
23. Rogers, J.C., Boldt, D., Kornfeld, S., Skinner, A. and Valeri, C.R., *Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972. **69**(7): p. 1685-1689.
24. Rogers, J.C. and Kerstiens, J.W., *Capping of DNA on phytohemagglutinin-stimulated human lymphoblasts*. *J Immunol*, 1981. **126**(2): p. 703-705.
25. Antonyak, M.A. and Cerione, R.A., *Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1165**: p. 147-173.
26. Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.J., *et al.*, *Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 180.
27. Gahan, P.B. and Stroun, M., *The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger*. *Cell Biochem Funct*, 2010. **28**(7): p. 529-538.
28. Dalpke, A., Frank, J. and Heeg, K., *Activation of toll -like receptor 9 by DNA from diferent bacterial species* *Infection and Inmunity*, 2006. **74**: p. 940-946.
29. Siess, D.C., Vedder, C.T., Merkens, L.S., Tanaka, T., *et al.*, *A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33655-33662.
30. Vellard, M., *The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. **14**(4): p. 444-450.
31. Shklyayeva, O.A., Mironova, N.L., Malkova, E.M., Taranov, O.S., *et al.*, *Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2008. **420**(1): p. 108-111.
32. Grimminger, C.M. and Danenberg, P.V., *Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011. **268**(1): p. 5-16.
33. Tamkovich, S.N., Cherepanova, A.V., Kolesnikova, E.V., Rykova, E.Y., *et al.*, *Circulating DNA and DNase activity in human blood*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1075**: p. 191-196.
34. Wald, M., Olejar, T., Sebkova, V., Zadinova, M., *et al.*, *Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001. **47 Suppl**: p. S16-22.
35. Novak, J.F. and Trnka, F., *Proenzyme therapy of cancer*. *Anticancer Res*, 2005. **25**(2A): p. 1157-1177.
36. Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Garcia-Lopez, P., Gutierrez-Díaz, B. and Duenas-Gonzalez, A., *Efectos antitumorales de la administracion sistémica de una combinacion de*

- DNase I y proteasas en un modelo de cáncer de colon en ratones inmunodeficientes in (En prensa)2013.*
37. N' soukpoé-Kossi, C.N., Diamantoglou, S. and Tajmir-Riahi, *DNase I – DNA interaction alters DNA and protein conformations*. *Biochem. Cell Biol.*, 2008. **86**: p. 244-250.
 38. Martinez Valle, F., Balada, E., Ordi-Ros, J. and Vilardell-Tarres, M., *DNase 1 and systemic lupus erythematosus*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(5): p. 359-363.
 39. Alcazar-Leyva, S., Ceron, E., Masso, F., Montano, L.F., *et al.*, *Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation*. *Med Sci Monit*, 2009. **15**(2): p. CR51-55.
 40. Patutina, O.A., Mironova, N.L., Ryabchikova, E.I., Popova, N.A., *et al.*, *Tumoricidal Activity of RNase A and DNase I*. *Acta Naturae*, 2010. **2**(1): p. 88-94.
 41. Patutina, O., Mironova, N., Ryabchikova, E., Popova, N., *et al.*, *Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I*. *Biochimie*, 2011. **93**(4): p. 689-696.
 42. Lopez-Otin, C. and Bond, J.S., *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30433-30437.
 43. Sakalova, A., Desser, L., Zavadova, E., Holomanova, D. and Mohr, T., *Enzyme therapy improved remission time, soluble TNF-receptors and b2- microglobulin concentrations in chemotherapy treated multiple myeloma patients* *Br J Haematol*, 1998. **102**(1): p. 353.
 44. da Silva, R.C., Oliveira, B.N., Motta, S.E., de Almeida, G.S., *et al.*, *Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluations of Papain (Carica papaya L.) using In vitro Assays*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. **2010**: p. 8.
 45. Mohr, T. and Desser, L., *Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro*. *BMC Complement Altern Med*, 2013. **13**: p. 231.
 46. Hibberd, C., Cossigny, D.A. and Quan, G.M., *Animal cancer models of skeletal metastasis*. *Cancer Growth Metastasis*, 2013. **6**: p. 23-34.
 47. Barth, R.F. and Kaur, B., *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*. *J Neurooncol*, 2009. **94**(3): p. 299-312.
 48. Wolfe, R.A., Sato, G.H. and McClure, D.B., *Continuous culture of rat C6 glioma in serum-free medium*. *J Cell Biol*, 1980. **87**(2 Pt 1): p. 434-441.
 49. Tyers, M. and Mann, M., *From genomics to proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 193-197.
 50. Righetti, P.G., Campostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M. and Astner, H., *Quantitative proteomics: a review of different methodologies*. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, 2004. **10**(3): p. 335-348.
 51. Tan, H.T., Lee, Y.H. and Chung, M.C., *Cancer proteomics*. *Mass Spectrom Rev*, 2012. **31**(5): p. 583-605.
 52. Li, X., Gong, Y., Wang, Y., Wu, S., *et al.*, *Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project*. *Proteomics*, 2005. **5**(13): p. 3423-3441.
 53. Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y. and Aebersold, R., *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9390-9395.
 54. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. and Lelong, C., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future*. *J Proteomics*, 2010. **73**(11): p. 2064-2077.

55. Gstaiger, M. and Aebersold, R., *Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(9): p. 617-627.
56. Wingren, C., James, P. and Borrebaeck, C.A., *Strategy for surveying the proteome using affinity proteomics and mass spectrometry*. Proteomics, 2009. **9**(6): p. 1511-1517.
57. Pernemalm, M., Orre, L.M., Lengqvist, J., Wikstrom, P., et al., *Evaluation of three principally different intact protein prefractionation methods for plasma biomarker discovery*. J Proteome Res, 2008. **7**(7): p. 2712-2722.
58. Matthiesen, R., *Mass Spectrometry Data Analysis*. Methods Mol Biol, ed. P. Humana 2007, Totowa, New Jersey. 331.
59. Thiede, B., Hohenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., et al., *Peptide mass fingerprinting*. Methods, 2005. **35**(3): p. 237-247.
60. Tessitore, A., Gaggiano, A., Ciciarelli, G., Verzella, D., et al., *Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors*. Int J Proteomics, 2013. **2013**: p. 125858.
61. Kjonniksen, I., Storeng, R., Pihl, A., McLemore, T.L. and Fodstad, O., *A human tumor lung metastasis model in athymic nude rats*. Cancer Res, 1989. **49**(18): p. 5148-5152.
62. Eliceiri, K.W., Berthold, M.R., Goldberg, I.G., Ibanez, L., et al., *Biological imaging software tools*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 697-710.
63. Schaaij-Visser, T.B., de Wit, M., Lam, S.W. and Jimenez, C.R., *The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(11): p. 2242-2258.
64. Watanabe, K., Sakamoto, M., Somiya, M., Amin, M.R., et al., *Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region*. Neurol Res, 2002. **24**(5): p. 485-490.
65. Wang, W., Bu, B., Xie, M., Zhang, M., et al., *Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases*. Prog Neurobiol, 2009. **89**(1): p. 1-17.
66. Zhang, H., Wu, L.M. and Wu, J., *Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines*. Mediators Inflamm, 2011. **2011**: p. 949072.
67. Starck, M., Bertrand, P., Pepin, S., Schiele, F., et al., *Effects of pro-inflammatory cytokines on apolipoprotein E secretion by a human astrocytoma cell line (CCF-STTG1)*. Cell Biochem Funct, 2000. **18**(1): p. 9-16.
68. Lippitz, B.E., *Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. e218-228.
69. Doustjalali, S.R., Yusof, R., Yip, C.H., Looi, L.M., et al., *Aberrant expression of acute-phase reactant proteins in sera and breast lesions of patients with malignant and benign breast tumors*. Electrophoresis, 2004. **25**(14): p. 2392-2401.
70. Abdul-Rahman, P.S., Lim, B.K. and Hashim, O.H., *Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods*. Electrophoresis, 2007. **28**(12): p. 1989-1996.
71. Liu, Y., Sainz, I.M., Wu, Y., Pixley, R., et al., *The inhibition of tube formation in a collagen-fibrinogen, three-dimensional gel by cleaved kininogen (HKa) and HK domain 5 (D5) is dependent on Src family kinases*. Exp Cell Res, 2008. **314**(4): p. 774-788.
72. Wang, J., Wang, X., Lin, S., Chen, C., et al., *Identification of kininogen-1 as a serum biomarker for the early detection of advanced colorectal adenoma and colorectal cancer*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70519.

73. Dimberg, J., Strom, K., Lofgren, S., Zar, N., *et al.*, *Expression of the serine protease inhibitor serpinA3 in human colorectal adenocarcinomas*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(3): p. 413-418.
74. Sieben, N.L., Oosting, J., Flanagan, A.M., Prat, J., *et al.*, *Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(29): p. 7257-7264.
75. Irshad, M. and Dubey, R., *Apolipoproteins and their role in different clinical conditions: An overview*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2005. **42**: p. 73-80.
76. Tolosano, E. and Altruda, F., *Hemopexin: structure, function, and regulation*. *DNA Cell Biol*, 2002. **21**(4): p. 297-306.
77. Soiffer, R.J., Murray, C., Ritz, J., Phillips, N., *et al.*, *Recombinant interleukin-2 infusions and decreased IgG2 subclass concentrations*. *Blood*, 1995. **85**(4): p. 925-928.
78. Wei, J., Barr, J., Kong, L.Y., Wang, Y., *et al.*, *Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(2): p. 461-473.
79. Lefterov, I., Fitz, N.F., Cronican, A.A., Fogg, A., *et al.*, *Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(47): p. 36945-36957.
80. Keeney, J.T., Swomley, A.M., Forster, S., Harris, J.L., *et al.*, *Apolipoprotein A-I: insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration*. *Proteomics Clin Appl*, 2013. **7**(1-2): p. 109-122.
81. Liu, Y., Luo, X., Hu, H., Wang, R., *et al.*, *Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51748.
82. Li, H., Li, C., Wu, H., Zhang, T., *et al.*, *Identification of Apo-A1 as a biomarker for early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma*. *Proteome Sci*, 2011. **9**(1): p. 21.
83. Cui, Y., Huang, M., He, Y., Zhang, S. and Luo, Y., *Genetic ablation of apolipoprotein A-IV accelerates Alzheimer's disease pathogenesis in a mouse model*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(3): p. 1298-1308.
84. Lv, S., Gao, J., Zhu, F., Li, Z., *et al.*, *Transthyretin, identified by proteomics, is overabundant in pancreatic juice from pancreatic carcinoma and originates from pancreatic islets*. *Diagn Cytopathol*, 2011. **39**(12): p. 875-881.
85. Ding, H., Liu, J., Xue, R., Zhao, P., *et al.*, *Transthyretin as a potential biomarker for the differential diagnosis between lung cancer and lung infection*. *Biomed Rep*, 2014. **2**(5): p. 765-769.
86. Gollapalli, K., Ray, S., Srivastava, R., Renu, D., *et al.*, *Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme*. *Proteomics*, 2012. **12**(14): p. 2378-2390.

Anexos

Resultados Protein pilot

En cada impresión de pantalla del software se muestra la cobertura en la secuencia de la proteína identificada. De color **verde** se muestra el péptido encontrado en la muestra digerida, que tiene una coincidencia exacta con la secuencia de la base de datos utilizada. Cuando se observan tres o más péptidos identificados en verde, se cuenta con un mayor porcentaje de cobertura y en consecuencia mayor certeza en la identificación. La parte de la secuencia que se encuentra de color **amarillo** indica que para que la secuencia del péptido determinado en la muestra analizada por masas, coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar un cambio en la secuencia, tal como: sustitución de un aminoácido, una desaminación, etc. La parte de la secuencia que se encuentra de color **rojo** indica que para que la secuencia del péptido determinado en la muestra analizada por masas, coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar varios cambios. Ejemplo: Sustitución de aminoácidos, desaminación, oxidación, etc. Cuando no se encuentra ninguna coincidencia entre los péptidos encontrados y la base de datos, el sistema muestra la pantalla en blanco y la leyenda "No Data Showing". En la parte superior de cada impresión de pantalla, se indica el nombre de la muestra que le asignó el usuario

MS-2014-005-260

The screenshot displays the ProteinPilot software interface. At the top, it shows the sample ID 'MS-2014-005-260' and the logo of the Instituto Nacional de Medicina Genómica. The main window is divided into several sections:

- Workflow Tasks:** A sidebar on the left with options like 'Analyze', 'View', 'Export', etc.
- Protein ID:** A table listing detected proteins. The first two rows are highlighted in green, indicating a perfect match with the database.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	8.69	8.69	38.1	sp P02650 ...	Apolipoprotein E OS=Rattus norvegicus GN=ApoE PE=1	RAT
2	0.80	0.80	6.1	sp G7N2E2 ...	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase OS=Photobact...	PHOL
- Protein Group 1:** A detailed view of the first protein, showing a table of peptides. The first row is highlighted in green, indicating a perfect match.

N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	Mass	Pre. MW	I
1	8.69	8.69	sp P02650 ...	Apolipoprotein	2.00	99	ESKLEYTDQLFGQSDPFRGALRR		cleaved A...	8.2715	2738.5488	1
- Protein Sequence Coverage:** A section at the bottom showing the full amino acid sequence of the protein with colored markers (green, yellow, red) indicating the detected peptides and their modifications.

MS-2014-005-261

ProteinPilot™ Software - [Result - E:\My Documents\BRSQUEDAS MALDI\Resultados: 2014\05 Dr. Juan Pablo\Sep 03\General 66\MS-2014-005-261.group]

File - Configure - Window - Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	7.13	7.13	21.7	sp P20760 ...	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=...	RAT

Proteins in Group						Peptides in Group						
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Pre. MW	Z
1	7.13	7.13	sp P20760 ...	Ig gamma-2A c	2.80	99	GFVFPDLYTEK			8.857	1514.7538	1
					2.80	99	VNSGAFPAFIEK			8.814	1378.8865	1
					2.80	99	VTCVVDLSQDFEIV	CarbamidomethylCQ3		8.819	1628.9790	1
					8.27	81	SYSELPTVIR			8.887	1128.7311	1
					8.41	61	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.132	2356.2360	1
					8.80	59	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.131	2356.2644	1
					8.80	60	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.131	2356.2386	1
					8.80	4	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.188	2356.2431	1
					8.80	4	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.117	2356.2391	1
					8.80	59	GFVFPDLYTEK			8.873	1514.7554	1
					8.80	59	GFVFPDLYTEK			8.870	1514.7351	1
					8.80	59	GFVFPDLYTEK			8.130	1514.8340	1
					8.80	59	GFVFPDLYTEK			8.118	1514.8317	1

Protein Sequence Coverage

```

M E T T A P F Y F L A P T A L K D S R Y T L C L V R Y F F P P V T Y R R A L E R G V T F F A V L Q S L Y T L T E V T F T R R G A Y T C V R A P A A T T E V S K E I V P R C S P C C T G E V S V Y L F P F K T R V S L T I
L T L Y V T C V V D L S Q D F E I V R V S G A F P A F I E K V S G A F P A F I E K L I E P E G T P P A Q V T T R A F F E E R T G S Q A I T C V F G F P P D L Y T E W
K R I P G Q E F T S E R F T E T S R Y T L S Y L R K R T W Q Q N T T C P L R E G L R I R T E L S R I S P E

```

MS-2014-005-262

ProteinPilot™ Software - [Result - E:\My Documents\BRSQUEDAS MALDI\Resultados: 2014\05 Dr. Juan Pablo\Sep 03\General 64\MS-2014-005-262.group]

File - Configure - Window - Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	8.32	8.32	35.1	sp P20760 ...	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=...	RAT

Proteins in Group						Peptides in Group						
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Pre. MW	Z
1	8.32	8.32	sp P20760 ...	Ig gamma-2A c	2.80	99	GFVFPDLYTEK			8.859	1514.7701	1
					2.80	99	VNSGAFPAFIEK			8.875	1378.8826	1
					2.80	99	VTCVVDLSQDFEIV	CarbamidomethylCQ3		8.195	1628.8773	1
					1.80	80	SYSELPTVIR			8.131	1128.7281	1
					8.82	59	FSWIDQVNTAQTHAFK			8.138	2356.2498	1
					8.28	59	HTFFNIDYGSYLSK			8.873	1826.8172	1
					8.82	4	ECDFCGCTGSEVSSWFIFPK	CarbamidomethylCQ2 CarbamidomethylCQ5 CarbamidomethylCQ7		8.132	2371.1576	1
					8.80	<1	ECDFCGCTGSEVSSWFIFPK	CarbamidomethylCQ2 CarbamidomethylCQ5 CarbamidomethylCQ7		8.185	2371.1367	1
					8.80	<1	ECDFCGCTGSEVSSWFIFPK	CarbamidomethylCQ2 CarbamidomethylCQ5 CarbamidomethylCQ7		8.138	2371.1582	1
					8.80	1	ECDFCGCTGSEVSSWFIFPK	Glu-pyr-Glu(8) term. CarbamidomethylCQ3		8.278	2366.2418	1

Protein Sequence Coverage

```

M E T T A P F Y F L A P T A L K D S R Y T L C L V R Y F F P P V T Y R R A L E R G V T F F A V L Q S L Y T L T E V T F T R R G A Y T C V R A P A A T T E V S K E I V P R C S P C C T G E V S V Y L F P F K T R V S L T I
L T L Y V T C V V D L S Q D F E I V R V S G A F P A F I E K V S G A F P A F I E K L I E P E G T P P A Q V T T R A F F E E R T G S Q A I T C V F G F P P D L Y T E W
K R I P G Q E F T S E R F T E T S R Y T L S Y L R K R T W Q Q N T T C P L R E G L R I R T E L S R I S P E

```



MS-2014-005-263

ProteinPilot® Software - [Result : E:\My Documents\BOSQUEIDAS MALDI\Resultados: 2014\05 Dr. Juan Pablo\Sep 03\General 66%\MS-2014-005-263.group]

File - Configure - Window - Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analyze Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	3.09	3.09	12.4	sp P20760 ...	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=...	RAT

Protein Group 1

Proteins in Group				Peptides in Group								
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	IMass	Protein MW	Z
1	3.09	3.09	sp P20760 ...	Ig gamma-2A c	0.00	37	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.0040	1028.8926	1	
					0.00	42	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.0782	1028.8771	1	
					0.00	7	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.0054	1028.8852	1	
					0.00	44	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.1291	1029.4260	1	
					1.05	31	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.1365	1029.4354	1	
					0.00	46	VWGGAFPAIEK		0.0401	1228.4832	1	
					2.00	39	VWGGAFPAIEK		0.0441	1228.4887	1	
					0.00	37	VWGGAFPAIEK		0.0403	1228.4854	1	
					0.00	1	VWGGAFPAIEK		0.0095	1228.7430	1	
					0.00	36	VWGGAFPAIEK		0.0039	1228.7290	1	
					0.00	9	VWGGAFPAIEK		0.0780	1228.7221	1	
					0.05	10	QVYFDLTYEK		0.0049	1014.7750	1	
					0.00	3	QVYFDLTYEK		0.0039	1014.8020	1	

Protein Sequence Coverage

```

M E T T A P S T Y L L A P T A L S D R R T L G L V R V F F P Y V Y N D S L S G V R T F F A V L G S L Y L T S V Y F F E T N G S L V T C M A P L S T F P D S K V F R E C I F S C T G S P T S R Y L F F F T S D L T L
L T L F Q F P V Y S L L Q S R E W F F F F F I S V E V E T A Q S A F E C M S T L R S D L F L Y R S D L M G T F C L V S G A F P A P I E K L S S P E T F P Q V Y T A P F E E R T G Q S L T C V R L Q F P P D L T Y E
R S D S Q P G E N T D T F F T M D G S T L T S L V L R K E T Q Q G M T F C V L R E G L M H R T E E L S S P S E

```



MS-2014-005-264

ProteinPilot® Software - [Result : E:\My Documents\BOSQUEIDAS MALDI\Resultados: 2014\05 Dr. Juan Pablo\Sep 03\General 66%\MS-2014-005-264.group]

File - Configure - Window - Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analyze Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	6.64	6.64	27.0	sp P20760 ...	Ig gamma-2A chain C region OS=Rattus norvegicus GN=...	RAT

Protein Group 1

Proteins in Group				Peptides in Group								
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	IMass	Protein MW	Z
1	6.64	6.64	sp P20760 ...	Ig gamma-2A c	2.00	89	QVYFDLTYEK		0.0055	1014.7737	1	
					2.00	89	VWGGAFPAIEK		0.0511	1228.4843	1	
					2.00	89	VTCTVYDLSGDPEVR	Carbamidomethyl(CQ2)	0.1316	1029.4241	1	
					0.34	14	VYDLSGDPEVR		0.0041	1128.8800	1	
					0.30	38	FVNFIDVQVNTMADDAEIK		0.1207	2306.2488	1	
					0.00	1	FVNFIDVQVNTMADDAEIK		0.1300	2306.2527	1	
					0.00	1	FVNFIDVQVNTMADDAEIK		0.1304	2306.2580	1	
					0.00	89	QVYFDLTYEK		0.0003	1014.7740	1	
					0.00	84	QVYFDLTYEK		0.1271	1014.8337	1	
					0.00	81	QVYFDLTYEK		0.1080	1014.8100	1	
					0.00	88	QVYFDLTYEK		0.0680	1014.7778	1	
					0.00	3	QVYFDLTYEK		0.1077	1014.8153	1	
					0.00	1	WFFDIDVGSVLYSK	Oxidation(MG4)	0.0034	1061.8343	1	

Protein Sequence Coverage

```

M E T T A P S T Y L L A P T A L S D R R T L G L V R V F F P Y V Y N D S L S G V R T F F A V L G S L Y L T S V Y F F E T N G S L V T C M A P L S T F P D S K V F R E C I F S C T G S P T S R Y L F F F T S D L T L
L T L F Q F P V Y S L L Q S R E W F F F F I S V E V E T A Q S A F E C M S T L R S D L F L Y R S D L M G T F C L V S G A F P A P I E K L S S P E T F P Q V Y T A P F E E R T G Q S L T C V R L Q F P P D L T Y E
R S D S Q P G E N T D T F F T M D G S T L T S L V L R K E T Q Q G M T F C V L R E G L M H R T E E L S S P S E

```


MS-2014-005-321

Instituto Nacional de Medicina Genómica

ProteinPilot® Software - [Result - E:\My Documents\BUSQUEDAS MALDI\Resultados 2014\05 Dr Juan Pablo\Dic: 10\general 66\MS-2014-005-321.group]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	16.08	16.08	34.3	sp P20059 ...	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3	RAT
2	1.05	1.05	5.9	sp Q7N2B2 ...	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase OS=Photobact...	PHOLL

Protein Group 1

Proteins in Group					Peptides in Group									
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Coef	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Pre. MW	Z	Δ	
1	16.08	16.08	sp P20059 ...	Hemopexin OS=	2.80	99	DYFISCPGR	CarbamidomethylCQ26		0.1554	1113.467	1		
					2.80	99	ELGSF7GSLDITDAAFSCPGSSK	CarbamidomethylCQ29		0.3240	2405.468	1		
					2.80	99	FWPTGSEYFPEFLDAR		missed R.Y...	0.2680	1927.2632	1		
					2.80	99	GATYMFSGSYHR			0.2157	1561.8895	1		
					2.80	99	LFQEFPGIYFPDAAVECHR	CarbamidomethylCQ29		0.3260	2471.4839	1		
					2.80	99	SGRATGKLSVPHK			0.2515	1797.8896	1		
					1.40	96	WDFATR			0.1586	1127.4774	1		
					1.22	94	SLPQKWSLGGSD	CarbamidomethylCQ24	missed K.V...	0.2227	1755.5192	1		
					0.77	83	YYCQGR	CarbamidomethylCQ23		0.1540	1078.6882	1		
					0.43	43	GRQSEGLYFQGR	CarbamidomethylCQ23	missed R.K...	0.2437	1855.1119	1		
					0.24	42	QEFYR			0.1854	792.4972	1		
					0.41	3	FWPTGSEYFPR			0.1783	1215.8881	1		
					0.40	99	DYFISCPGR	CarbamidomethylCQ26		0.1624	1113.4637	1		

Protein Sequence Coverage

```

MAPTVALLVLLGLGCLAVANPLFAEETVARGENGTKPSVIEKCDARWFDATTDHDTGLFFDGEFVVRDGGIRELIEEWDVTVSDAAFRGPDVFLIKEDKVVYVFFKEDKDTF
LFLQEEFPIYFPFAAEVCHRQCSGLVLYFQGRWYWFDAIKTQEKRPFAVGNCTALLFLERYCYQGRFLIFWPTGSEYFPEFLDARDFYISCPGRDDELSDDTAGSDSTPREDKCH
LPPGLSALLDGVHGAETAFSSGQWRDLSISDQVWRFYLAHWYQPSADLAFYDREYFLDQDQVYFLTWGRELVSDFYFLEELGSPFGLSDTDAAFSCPGSSKTYVDSRSLWLDK
SQAQTWELSWPHKIDGLCLKSLGPTCSGDPRLFIQPHLVCYSDINLKAASLPPQKQVNSLIGSQ
  
```

MS-2014-005-323

Instituto Nacional de Medicina Genómica

ProteinPilot® Software - [Result - E:\My Documents\BUSQUEDAS MALDI\Resultados 2014\05 Dr Juan Pablo\Dic: 10\Rattus Norvegicus 66\MS-2014-005-323.group]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	14.71	14.71	44.4	sp P04639 ...	Apolipoprotein A-I OS=Rattus norvegicus GN=Apoa1 PE=...	RAT
2	1.70	1.70	0.8	tr D3ZX8 ...	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ OS=Rattus nor...	RAT

Protein Group 1

Proteins in Group					Peptides in Group									
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Coef	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Pre. MW	Z	Δ	
1	14.71	14.71	sp P04639 ...	Apolipoprotein	2.80	99	DSGRDYVSQFESSTLGR		missed R.D...	0.3111	1875.1757	1		
					2.80	99	LTEIKDDPFLIEQTK		missed K.N...	0.2690	1936.3114	1		
					2.80	99	HWFLIEQTK			0.1864	1351.8750	1		
					2.80	99	QKLEFLQTELAK		missed K.L...	0.1945	1391.9717	1		
					2.80	99	QMLMLRMDYLGSTVGR			0.3282	2128.4194	1		
					2.80	99	VKDFATVVDAYK			0.1760	1463.9576	1		
					1.70	98	DEPDSWR		cleaved G...	0.1814	1158.4788	1		
					0.72	81	VVAEYR		missed R.D...	0.1640	1115.7312	1		
					0.25	40	HQPHLDFQKMEVEYR	Oxidation(t)Q4	missed K...	0.2690	2553.5239	1		
					0.40	98	DSGRDYVSQFESSTLGR		missed R.D...	0.2580	1875.1234	1		
					0.40	99	LTEIKDDPFLIEQTK		missed K.N...	0.2815	1936.3232	1		
					0.40	99	LTEIKDDPFLIEQTK		missed K.N...	0.2695	1936.3113	1		
					0.40	99	LTEIKDDPFLIEQTK		missed K.N...	0.3075	1936.3402	1		

Protein Sequence Coverage

```

RKAALVALVFLTCQAEVFPDDEPQSDHVDKFAVYVDVAKDSGRDVSQFESSTLGRQLMLRMLDMDYLGSTVGRDQGLQPTQEFHAKLEKTDLNRNEDDLNRYQKQFLDEPQ
EKWKEVETPKLEPLQTELKDAKRNRLVVAEYRDFRNVNADALRKFGLYDORRNLQPLTEIKDDPFLIEQTKDDELKTLQEKAFDGLDGLPVLVAEAKINRIDEAKK
LNA
  
```

MS-2014-005-324

Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO

ProteinPilot® Software - [Result - E:\My Documents\BIOQUIMICAS MALDI\Resultados 2014\05 Dr Juan Pablo\Dic 10\Rattus Norvegicus 665\MS-2014-005-324.group]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View**
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	10.01	10.01	73.5	sp P02767 ...	Transthyretin OS=Rattus norvegicus GN=Ttr PE=1 SV=1	RAT

Proteins Detected

Proteins in Group		Peptides in Group										
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	iMass	Protein MW	Z
1	10.01	10.01	sp P02767 ...	Transthyretin	0.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3905	2516.5889	1
					2.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3409	2516.5493	1
					0.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3702	2516.5786	1
					0.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3710	2516.5793	1
					0.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3524	2516.5408	1
					0.00	59	MLGISFFNYEYVFTARDGSR			0.3563	2516.5647	1
					0.00	55	NYTIALLSPYSYSTAVVSNPQR	Deamidated(N@21 Asn->Ser@24)		0.2770	2570.4810	1
					2.00	59	NYTIALLSPYSYSTAVVSNPQR			0.3209	2596.4118	1
					0.00	59	NYTIALLSPYSYSTAVVSNPQR			0.3715	2596.4523	1
					0.00	59	NYTIALLSPYSYSTAVVSNPQR			0.3612	2596.4421	1
					0.00	59	NYTIALLSPYSYSTAVVSNPQR			0.3629	2596.4438	1
					0.00	59	TADGSEVFFASGK			0.1914	1351.7958	1

Protein Sequence Coverage

```

MSLRFLLCLGLIFASEAPGQAGEKCLPLVFLDVAQSPAVDVAIVVFKTADGSEVFFASGKTAESGELNGLTIDKFTGVVYVLDLTKITVIALGISFFNYEYVFTARDGSRGKDTIA
ALLSPYSYSTAVVSNPQR
  
```

MS-2014-003-042

Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO

ProteinPilot® Software - [Result - E:\My Documents\BIOQUIMICAS MALDI\Resultados 2015\003\Rattus Norvegicus\MS-2015-003-042.group]

File Configure Window Help

Workflow Tasks

- Analyze
- Identify Proteins...
- View**
- Analysis Log...
- Result...
- Export
- Peptide Summary...
- Protein Summary...

Protein ID		Spectra		Summary Statistics		
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	20.14	20.14	36.5	tr Q5PGU1 ...	Kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=King1 PE=2 SV=1	RAT
2	1.10	17.24	34.9	tr Q63581 ...	Rat T-kininogen (T-KO) OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	RAT
3	1.10	1.10	1.0	sp Q9Z0U4 ...	Isoform 1D of Gamma-aminobutyric acid type B receptor...	RAT

Proteins Detected

Proteins in Group		Peptides in Group										
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	iMass	Protein MW	Z
1	20.14	20.14	tr Q5PGU1 ...	Kininogen 1 (K1)	2.00	50	ATGLYVAFYIYVGFLEK			0.2717	1406.1408	1
					2.00	50	DGAGTLTYFE			0.3625	1129.5219	1
					1	0.00	20.14	sp P19186 ...	T-kininogen 1 (K2)	0.0705	2427.2068	1
					2.00	50	EALDRIKAGDADDMDFYFE			0.4889	862.4265	1
					2.00	50	EDFFLEK			0.4889	862.4265	1
					2.00	50	FFVATLGRITPK	Carbamidomethyl-Cys		0.0302	1024.0115	1
					2.00	50	HWLFLK			0.4939	861.6268	1
					2.00	50	GEESAGELRGGDTYFQATDIAL	Deamidated(N@21 Asn->Ser@24)		0.3870	2059.2039	1
					2.00	50	GEESAGELRGGDTYFQATDIAL	Deamidated(N@21 Asn->Ser@24)		0.1017	2073.2067	1
					2.00	50	IGEDYFVAGDITK	Carbamidomethyl-Cys		0.2229	1408.0812	1
					2.00	50	IKGLDGGGK	Carbamidomethyl-Cys		0.2714	1407.2068	1
					0.14	20	ITVEELGKDFGFLRGGDLEK	Carbamidomethyl-Cys Carbamidomethyl-Cys		0.2840	3029.8207	1

Protein Sequence Coverage

```

MSLRFLLCLGLIFASEAPGQAGEKCLPLVFLDVAQSPAVDVAIVVFKTADGSEVFFASGKTAESGELNGLTIDKFTGVVYVLDLTKITVIALGISFFNYEYVFTARDGSRGKDTIA
ALLSPYSYSTAVVSNPQR
  
```