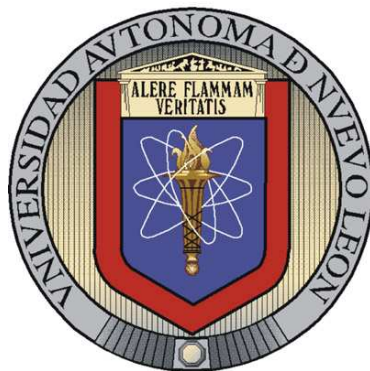


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**PERFIL ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS EN ORINA PARA EL  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEFROPATÍAS**

**Por**

**AMANDA BERENICE MERCADO MOREIRA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
con Especialidad en Química Biomédica**

**Julio de 2008**

Presentado por:

Q.F.B. AMANDA BERENICE MERCADO MOREIRA

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Departamento de Medicina Molecular y Terapia Celular de Oca Hospital bajo la dirección de la Dra. Paula Cordero Pérez, la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla.

---

Dra. Paula Cordero Pérez

Directora de Tesis

**PERFIL ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS EN ORINA PARA EL  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEFROPATÍAS**

Aprobación de Tesis

---

Dra. Paula Cordero Pérez

Directora de Tesis

---

Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-Director de Tesis

---

Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Co-Director de Tesis

---

Dr. Med. Dionicio A. Galarza Delgado

Subdirector de Estudios de Posgrado

## Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi hija Éleanor Sofía que desde que supe de su llegada, ha sido mi fuente de alegría, energía e inspiración.

### A mi familia

Mi mamá la Sra. Graciela Moreira Lara, a mi papá el Sr. Armando José Mercado Dfáz y a mis hermanos Oliver, Gustavo y Gonzalo.

A Horacio que me ha apoyado tanto en esta etapa tan importante de mi vida.

### A mis amigos y compañeros

## Agradecimientos

A mi hija Sofía que con el simple hecho de existir me llena de energía.

A mi mamá Graciela Moreira Lara y mi papá Armando José Mercado Díaz que han sido un gran apoyo a lo largo de mi vida.

A Horacio que me ha apoyado y comprendido tanto en esta etapa tan importante de mi vida.

A mis hermanos Oliver, Gustavo y Gonzalo que me apoyan y alientan a salir adelante.

A mis amigos de la Unidad de Hígado, a Liliana, Bricehidy, Marcelino, Chen y Miguel que me han ayudado de una forma o de otra a lograr mis propósitos.

A mi amiga Clarita de Bioquímica, que me ha acompañado y ayudado incondicionalmente siempre.

A mis maestros, compañeros y amigos de Química Analítica, a la Dra. Verónica Rivas y la Dra. Ma. De la Luz Salazar, por su disponibilidad de apoyar; a mi amiga Graciela, que estuvimos juntas en los momentos más cruciales durante el curso de las materias; a Maribel, a Martha e Ivonne que me apoyaron desinteresadamente durante el tiempo que tomé mis materias. A todos por sus muestras de cariño a la llegada de mi bebé.

A la M.C. Adelina y a la Q. Rosario Salazar por apoyarme durante el trabajo experimental en el Departamento de Medicina Molecular y Terapia Celular de Oca Hospital.

Al Dr. Miguel Escobedo, Dra. Connie Sánchez, Dra. Maritza de la Paz, Dra. Vicky, Dr. Homero Zapata, Dra. Gaby Alarcón, Lic. Tere Mtz y Lic. Irma de Osio de Coordinación de Trasplantes que me apoyaron en el seguimiento de los pacientes y a los pacientes que aceptaron participar en el protocolo.

A Ethel y Berenice por compartirme de su tiempo apoyando en la revisión de expedientes clínicos.

A la Dra. Ana María Rivas por compartirme sus conocimientos, darme el consejo acertado en el momento oportuno y permitirme hacer uso de las instalaciones del Departamento de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

A la Dra. Noemí Waksman por los consejos y sugerencias a este trabajo a lo largo de su desarrollo.

A la Dra. Paula Cordero Pérez por darme la oportunidad de seguir estudiando y de darme la oportunidad de desarrollar este trabajo.

A la Dra. Linda Muñoz por permitirme estudiar durante este tiempo.

Al Dr. Genaro Levinson por permitirme hacer uso de las instalaciones de Oca Hospital.

Al Dr. Luis Eugenio Todd Pérez y al COCYTE de Nuevo León por el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.

Al CONACYT por el apoyo económico durante mis estudios de maestría.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
NOMENCLATURA Y SÍMBOLOS.....	iv
RESUMEN.....	vii
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
1.1 Riñones.....	1
1.1.1 Morfología microscópica y fisiología renal.....	2
1.1.2 Fisiopatología renal: proteinuria.....	3
1.2 Incidencia de enfermedades renales y perspectiva global....	3
1.2.1 Diabetes mellitus y sus consecuencias.....	4
1.2.2 Nefropatía diabética.....	5
1.3 Tratamientos para la insuficiencia renal crónica.....	7
1.3.1 Trasplante renal.....	8
1.3.1.1 Trasplantes renal en México.....	8
1.3.1.2 Inmunosupresión post-trasplante.....	9
1.3.1.3 Rechazo al injerto.....	10



1.4	Análisis proteómico.....	11
1.4.1	Electroforesis bidimensional.....	12
1.4.2	Proteómica en enfermedades renales y trasplante renal.....	14
1.5	Justificación.....	17
1.6	Objetivo general.....	18
1.7	Objetivos específicos.....	18

## **CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS** **19**

2.1	Materiales.....	19
2.1.1	Pacientes incluidos en el estudio.....	19
2.1.1.1	Criterios de inclusión generales.....	19
2.1.1.2	Grupos de estudio y criterios de inclusión particulares.....	20
2.1.1.3	Criterios de exclusión.....	20
2.1.1.4	Seguimiento de la evolución del paciente.....	20
2.1.2	Reactivos.....	21
2.1.2.1	Preparación de reactivos.....	22
2.1.3	Material general.....	22
2.1.4	Equipos.....	23
2.1.4.1	Software de análisis de datos.....	24
2.2	Métodos.....	25
2.2.1	Revisión de expedientes clínicos.....	25

2.2.2	Obtención de sangre periférica y de catéter de los pacientes.....	25
2.2.3	Obtención de suero a partir de las muestras de sangre.....	25
2.2.4	Recolección y preparación de muestras de orina.....	26
2.2.5	Determinación de parámetros bioquímicos en suero.....	26
2.2.5.1	Determinación de Glucosa en suero.....	26
2.2.5.2	Determinación de Creatinina en suero.....	27
2.2.5.3	Determinación de Hemoglobina en sangre total.....	28
2.2.6	Precipitación de proteínas de orina.....	28
2.2.7	Limpieza de muestras de orina.....	29
2.2.8	Concentración de muestras de orina por ultra centrifugación.....	30
2.2.9	Eliminación de albúmina en orina.....	31
2.2.10	Precipitación de proteínas posterior a eliminación de albúmina.....	33
2.2.11	Cuantificación de proteínas.....	34
2.2.12	Rehidratación de tiras de IPG.....	35
2.2.13	Isoelectroenfoque.....	36
2.2.14	Equilibrio de tiras de IPG.....	37
2.2.15	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).....	38
2.2.16	Tinción – destinción de geles.....	40

2.2.17	Digitalización de geles.....	40
2.2.18	Análisis de imágenes.....	41
2.2.18.1	Introducción de datos complementarios	
2.2.18.2	Validación del método electroforético.....	42
2.2.18.3	Empalme de imágenes e identificación de manchas características.....	42
 <b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b>		 <b>44</b>
3.1	Establecimiento mediante parámetros bioquímicos de las características de las diversas nefropatías de estudio.....	44
3.1.1	Pacientes incluidos en el estudio.....	44
3.1.2	Parámetros bioquímicos determinados y consultados en el expediente clínico.....	45
3.2	Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción de proteínas (pretratamiento) y desarrollo del método electroforético.....	47
3.2.1	Pretratamiento por precipitación con acetona.....	48
3.2.2	Limpieza y precipitación con acetona.....	49
3.2.3	Eliminación de albúmina, precipitación con acetona.....	51
3.2.4	Concentración por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona.....	51

3.2.5	Geles característicos de los grupos de estudio.....	53
3.3	Validación del método de electroforesis bidimensional de proteínas en orina.....	57
3.3.1	Precisión del método.....	57
3.3.2	Exactitud del método.....	58
3.4	Identificación de los diferentes perfiles de expresión proteica entre los grupos de estudio.....	60
3.4.1	Detección, edición de manchas, introducción de datos complementarios y reporte de manchas.....	60
3.4.2	Empalme de imágenes e identificación de manchas características.....	61
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN</b>		<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES</b>		<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS</b>		<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 7. ANEXOS</b>		<b>74</b>
7.1	Carta de consentimiento informado.....	74
7.2	Preparación de reactivos.....	77

<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>81</b>
8.1 Artículos.....	81
8.2 Libros, insertos y manuales.....	86
8.3 Páginas de internet.....	87

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Antecedentes de la aplicación de la proteómica para la búsqueda de biomarcadores en enfermedades renales.....	16
Tabla 2. Variables demográficas de los pacientes de los grupos de estudio.....	45
Tabla 3. Parámetros bioquímicos de los grupos de estudio.....	46
Tabla 4. Concentración de proteínas después del pretratamiento.....	48
Tabla 5. Valores prácticos del calibrador en las muestras (tripsinógeno PM = 24 kDa; pI = 9.3).....	57
Tabla 6. Valores calculados para determinar precisión del método.....	58
Tabla 7. Prueba T para valores de pI obtenidos.....	58
Tabla 8. Prueba T para valores de PM obtenidos.....	59
Tabla 9. Manchas características del grupo de pacientes con rechazo agudo al injerto renal.....	63
Tabla 10. Manchas características del grupo de pacientes con nefropatía diabética.....	64

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Características fisiológicas del riñón.....	1
Figura 2	Filtro Ultracel Centricon.....	30
Figura 3	Proceso de eliminación de albúmina.....	32
Figura 4.	Gel de muestra con pretratamiento por precipitación con acetona.....	49
Figura 5.	Gel de muestra con pretratamiento por limpieza y precipitación con acetona.....	50
Figura 6.	Gel en donde se presenta un ejemplo de de muestra con pretratamiento por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona; 100 µg de proteína.....	51
Figura 7.	Gel de muestra con pretratamiento por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona; 150 µg de proteína.....	52
Figura 8.	Gel representativo del grupo de pacientes con nefropatía diabética.....	53

Figura 9.	Gel representativo del grupo de pacientes con rechazo al injerto renal.....	54
Figura 10.	Gel de paciente del grupo de evolución estable no característico del grupo.....	55
Figura 11.	Gel representativo del grupo de pacientes con evolución estable, característico en cuatro de los 5 pacientes.....	56
Figura 12.	Representación del análisis para la detección de manchas.....	60
Figura 13.	Ejemplo de un reporte de manchas.....	61
Figura 14.	Representación de la emisión del reporte de manchas de acuerdo a su identificación.....	62
Figura 15.	Reporte de información de manchas características de uno de los grupos de trabajo.....	62



## NOMENCLATURA Y SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrilo
CIP	Coctel Inhibidor de proteasas
cm	Centímetros
CsA	Ciclosporina A
CV	Coeficiente de variación
COCYTE	Coordinación de Ciencia y Tecnología
cols.	Colaboradores
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DM	Diabetes Mellitus
dpi	dots per inch (puntos por pulgada)
DTT	DL – Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos de América
g	Gramos
h	Horas
HTA	Hipertensión arterial
IAA	Iodoacetamida
IPG	Gradientes de pH inmovillizado
IRCP	Insuficiencia renal crónica permanente

M	Molar
MA	Microalbuminuria
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption ionization – Time of Flight (Ionización asistida por la matriz mediante desorción con láser – Tiempo de vuelo)
MEC	Matriz extracelular
min.	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de Peso Molecular
mRNA	RNA mensajero
N. A.	No Aplica
NaCl	Cloruro de Sodio
ND	Nefropatía Diabética
N. L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
NTA	Necrosis Tubular Aguda
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido Ribonucleico

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SELDI-TOF-MS	Surface – Enhanced Laser desorption/ ionization – Time of flight – Mass spectrometry (Ionización realizada por la superficie mediante desorción con láser – Tiempo de vuelo – Espectrometría de masas)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
2D	Doble dimensión o bidimensional
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μg	Microgramos
α	Alfa
β	Beta
≥	Mayor o igual
≤	Menor o igual
±	Mas menos
+	Mas

## **RESUMEN**

Q.F.B. Amanda Berenice Mercado Moreira

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: Perfil electroforético de proteínas en orina para el diagnóstico diferencial de nefropatías.

Número de páginas: 87

Área de estudio: Química Biomédica

Propósito y Método del Estudio: El rechazo agudo continúa siendo la principal causa de fracaso en el trasplante renal de donador cadavérico. La búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico de rechazo o diversas nefropatías ha incrementado el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método de electroforesis bidimensional para la detección de proteínas en orina que sea útil para el diagnóstico de nefropatías. Se incluyeron tres grupos de cinco pacientes, un grupo de pacientes con trasplante renal con rechazo al injerto renal confirmado por biopsia, un grupo de pacientes con trasplante renal con evolución estable y un grupo de pacientes con nefropatía diabética. Se probaron diferentes alternativas de pretratamiento de las muestras de orina, siendo la que arrojó mejores resultados la combinación de varias técnicas, que incluyeron la concentración utilizando ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación de proteínas con acetona. Las proteínas de las muestras fueron separadas por isoelectroenfoque (primera dimensión) y por electroforesis en geles de poliacrilamida 12% con SDS (segunda dimensión). Posteriormente los geles fueron teñidos, digitalizados y analizados con el programa ImageMaster, Amersham con el fin de verificar si existían proteínas características de cada grupo de estudio identificando punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM). Se realizó la validación del método determinando precisión y exactitud para la determinación de pI y PM tomando de referencia un estándar conocido.

Contribución y Conclusiones: Se encontraron 7 proteínas características del grupo de pacientes con rechazo al injerto renal (pI 5.5 - PM 34 kDa y pI 6.8 - PM 14.4 kDa, en cinco de los cinco pacientes; pI 5.2 - PM 32 kDa y pI 8.5 - PM 18kDa, en cuatro de los cinco pacientes; pI 4.6 - PM 23 kDa, pI 5.3 - PM 29 kDa y pI 4.5 - PM 28 kDa en 3 de los cinco pacientes. En el grupo con nefropatía diabética se encontraron 6 proteínas características (pI 4.8 - PM 50 kDa, pI 5.9 - PM 14 kDa y pI 6.4 - PM 31.5 kDa en cuatro de los cinco pacientes; pI 7.4 - PM 26 kDa, pI 4.9 - PM 14 kDa y pI 4.5 - PM 28 kDa en tres de los cinco pacientes). Dichas proteínas podrían ser candidatos a biomarcadores para el diagnóstico de rechazo agudo al injerto renal y ND respectivamente. Se encontró que el método fue exacto y preciso para la determinación de pI y PM.

---

**Dra. Paula Cordero Pérez, Directora de Tesis**

## CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

## 1.1 Riñones.

Los riñones son órganos ubicados retroperitonealmente y miden cerca de 11 cm de largo, aproximadamente 6 cm de diámetro y 2.5 cm de ancho, pesan entre 125 y 179 g cada uno (Figura 1). Dentro de sus funciones está el mantenimiento de la homeostasis, funciones endocrinas como el control de la presión arterial a través del mecanismo renina – angiotensina, la eliminación de sustancias de desechos nitrogenadas, la síntesis de eritropoyetina y la regulación del metabolismo fósforo y calcio. (Ulate, 2006)

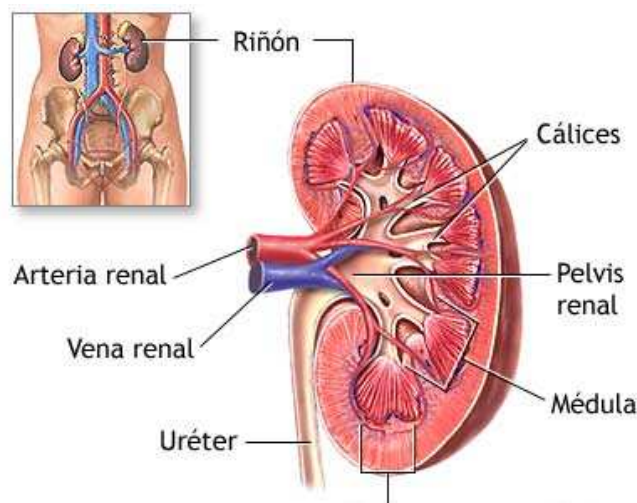


Figura 1. Características fisiológicas del riñón.

### **1.1.1 Morfología microscópica y fisiología renal.**

Los riñones están compuestos de pequeñas unidades estructurales conocidas con el nombre de nefronas (Xu *et al.*, 2005). Las nefronas constan de dos partes: el glomérulo donde la sangre que pasa a través de ellos es filtrada; y un sistema de túbulos conectados a los glomérulos, donde el filtrado es parcialmente reabsorbido y además pueden adicionarse solutos que salen de los capilares sanguíneos ubicados alrededor de los túbulos y llegan hasta la luz tubular; este proceso se conoce como secreción tubular (Ulate, 2006; Kumar *et al.*, 2002). Mientras que la filtración glomerular remueve iones y proteínas de bajo peso molecular del torrente sanguíneo, el proceso de reabsorción tubular previene la pérdida excesiva de los mismos. El delicado equilibrio de estos dos procesos caracteriza el funcionamiento normal renal. Como resultado del eficiente proceso de filtración y reabsorción en la nefrona, la orina de una persona normal muestra bajas concentraciones de proteínas (Kumar *et al.*, 2002). La concentración de proteínas en orina (50 – 120 mg/24 h) de una persona sana es inferior a la encontrada en el plasma humano (60 mg/dL) (Khan y Packer, 2006). La albúmina (de origen plasmático) y la proteína de Tamm-Horsfall (de origen renal) representan el 65% de las proteínas urinarias. Aproximadamente el 99% de las proteínas filtradas del plasma son reabsorbidas en el túbulo proximal por endocitosis que las traslada a los lisosomas, donde son hidrolizadas a aminoácidos para posteriormente retornar a circulación sanguínea (Lorenzo *et al.*, 2002).

### **1.1.2 Fisiopatología renal: proteinuria.**

La presencia de abundante matriz extracelular (MEC) alrededor de los capilares glomerulares y la membrana basal de la cápsula de Bowman provee una barrera física para el paso de proteínas de alto peso molecular a través del glomérulo. El daño alrededor de la MEC del glomérulo da como resultado la liberación de proteínas hacia los túbulos y la aparición de proteínas séricas en la orina. Del mismo modo, una perturbación de las células epiteliales de los túbulos proximales puede causar una reabsorción ineficiente de proteínas urinarias que conducen a la pérdida de proteínas en la orina. Esta condición es clínicamente referida como proteinuria y es indicador de daño glomerular o tubular a los riñones (Kumar *et al.*, 2002; Vojtová *et al.*, 2007). Es sabido que bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas, se pueden producir cambios en la abundancia de proteínas como resultado de alteraciones en la transcripción o estabilidad del RNA mensajero (mRNA), e incluso como resultado de la regulación directa de la traducción o regulación de proteínas (Knepper, 2002).

### **1.2 Incidencia de enfermedades renales y perspectiva global.**

En nuestro país, la Encuesta Nacional de Salud del año 2000, reportó una frecuencia del 10.9% de enfermedad renal diagnosticada a nivel nacional,

Nuevo León tuvo una frecuencia de enfermedades renales diagnosticadas del 9%.

De acuerdo a los datos estadísticos se encontró como la principal causa de insuficiencia renal a la nefropatía diabética (ND), con un 44%, hipertensión arterial (HTA) en un 11%, glomerulonefritis crónica en un 6%, enfermedad renal quística en un 5% y 30% aproximadamente de causa desconocida (Olaiz G *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2007; Encuesta Nacional de Salud 2000).

### **1.2.1 Diabetes Mellitus y sus consecuencias.**

Ha incrementado la incidencia y prevalencia de DM en forma creciente en los últimos años a nivel mundial. En 2004 se hizo una estimación respecto al número global de pacientes diabéticos en el mundo, calculando que puede llegar a 366 millones de personas en el año 2025, sobre todo a expensas de la DM tipo 2. Curiosamente, entre los países que encabezan la lista en cuanto a crecimiento de DM figuran India, China, Indonesia y Pakistán al lado de países desarrollados como Estados Unidos de América (EUA), Italia y Japón (Wild *et al.*, 2004). Sólo en EUA, la diabetes afecta a 18.2 millones de personas, lo que equivale al 6.3% de la población (Martínez, 2008). En nuestro país, la prevalencia de DM en 2000 en adultos fue de 7% (Olaiz, *et al.*, 2003). Se estima que la prevalencia de DM tipo 2 puede aumentar al doble en los próximos 15 años siendo también la causa principal de enfermedad renal terminal (Rao *et al.*, 2007).



El número de personas con enfermedad renal terminal que son tratados con diálisis y trasplante está proyectado a incrementar de 340,000 en 1999 a 651,000 en el año 2010 (Levey *et al.*, 2003). Paralelamente a la pandemia de DM se observa un aumento de la ND como causa de enfermedad renal crónica terminal.

Desde hace algunos años se ha venido hablando de que un 15% de pacientes con DM tipo 1 y entre 20 y 40% de pacientes con DM tipo 2 presentarán afectación renal a lo largo de la evolución de la enfermedad diabética, lo que marcará la evolución hacia la ND establecida (Martínez, 2008).

### **1.2.2 Nefropatía diabética (ND)**

La ND se caracteriza en el paciente diabético por la aparición de proteinuria persistente ( $>0.5$  g/día) en ausencia de otras causas de enfermedad renal, que se acompaña generalmente de hipertensión arterial y de otras complicaciones microvasculares asociadas a la DM (Jain, *et al.*, 2005). El paso de macromoléculas y en particular proteínas a los túbulos y al mesangio como consecuencia de alteraciones en la permeabilidad glomerular, constituye un factor determinante en el desarrollo de esclerosis renal. La presencia de proteínas en la orina es útil para establecer el diagnóstico y la fase de progresión de la enfermedad.

El mesangio es determinante en los fenómenos de progresión de la enfermedad renal. La presencia de macromoléculas en esta región determina un efecto dañino para las células mesangiales, estimulando su proliferación y aumentando la producción y depósito de matriz mesangial, a la vez que conduce a la activación de mecanismos que van a dar lugar a la fibrosis presente en la insuficiencia renal crónica permanente (IRCP) (Macía *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005). Durante la evolución natural de la ND hacia la IRCP existen una serie de fases; en el caso de la DM tipo 1 abarca un periodo que oscila entre 25 a 30 años desde el momento del diagnóstico. Se puede establecer una división cronológica de cuatro fases, cada una de ellas con una duración aproximada de 10 años. Primera fase (precoz): corresponde al momento del diagnóstico de la diabetes, donde ya se han producido una serie de cambios tanto funcionales como estructurales. Estos hallazgos suelen asociarse con un defectuoso control glicémico junto a otras alteraciones metabólicas. La duración de este periodo oscila entre 7 y 13 años durante los cuales se desarrollan las alteraciones estructurales glomerulares. Del 30 al 40% de los pacientes evolucionan a fases más avanzadas. Segunda fase (microalbuminuria (MA)): Corresponde a la segunda década de la enfermedad y puede durar desde 7 hasta 20 años después del diagnóstico de DM. Se caracteriza por la aparición de MA que oscila entre 20 a 200  $\mu\text{g}/\text{min.}$ , lo que corresponde a un valor entre 30 y 300  $\text{mg}/\text{día}$ . Tercera fase (proteinuria): Ésta constituye la ND propiamente dicha, la proteinuria supera los 0.5  $\text{g}/\text{día}$  y produce un descenso progresivo de la tasa de filtración glomerular.

Cuarta fase (insuficiencia renal establecida): Se produce después de más de 30 años de diagnóstico de DM.

La presencia de proteinuria junto a un deterioro cada vez más severo de la función renal dan lugar a hallazgos clínicos y analíticos característicos: uremia, HTA, hiperuricemia, anemia, etc. Todo ello contribuye a un importante aumento de la morbilidad de estos pacientes, con una mayor prevalencia de amputaciones, ceguera e infarto de miocardio en el grupo de pacientes diabéticos que inician tratamiento renal sustitutivo (Macía *et al.*, 2001).

La ND constituye una de las causas mas frecuentes de entrada a los programas de diálisis. El inicio debe ser precoz. Una vez que la depuración de creatinina desciende por debajo de 15 mL/min., la HTA es difícilmente controlable y consecuentemente se presenta retinopatía y la función renal se deteriora con rapidez (De Francisco *et al.*, 2001).

### **1.3 Tratamientos para la insuficiencia renal crónica.**

Los tratamientos para los pacientes con IRCP son la hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal (Lorenzo *et al.*, 2002).

### **1.3.1 Trasplante renal.**

El trasplante se define como la transferencia de un órgano, tejido o célula de una parte del cuerpo a otra, o de un individuo a otro y que se integra al organismo (Mendoza y Huerta, 2002; Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos). El trasplante renal es el tratamiento de elección de la insuficiencia renal crónica terminal.

En comparación con la diálisis crónica, mejora la calidad de vida y disminuye la mortalidad de la mayoría de los pacientes (Soulillou, 2001; Li *et al.*, 2001).

#### **1.3.1.1 Trasplante renal en México.**

En México se cuenta con 406 programas activos de trasplantes de órganos y tejidos distribuidos en instituciones públicas y privadas, siendo los programas de trasplante renal y córnea los más relevantes en número, con 123 y 117 respectivamente, significando 60% del total de los programas. Desde que se inició el programa de trasplante renal en 1963 hasta 2007, en nuestro país se han realizado 21,915 trasplantes de riñón, de los cuales el 65% corresponde a trasplantes de donador vivo relacionado, 28% de donador cadavérico y 7% de donador vivo no relacionado ([www.cenatra.gob.mx](http://www.cenatra.gob.mx)).

En el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), a Junio de 2008 se han realizado 248 trasplantes de riñón; opuesto a lo que sucede a nivel nacional, en su mayoría han sido de donador cadavérico 70% (186 trasplantes) mientras que de donador vivo relacionado han sido minoría con un 30% (79 trasplantes) (Archivos Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González UANL).

#### **1.3.1.2 Inmunosupresión post- trasplante.**

Tras el trasplante renal es fundamental conseguir un equilibrio entre el efecto inmunosupresor de los fármacos y la respuesta inmunológica del huésped para evitar las infecciones oportunistas. El objetivo primario de la inmunosupresión es evitar el rechazo agudo en las primeras etapas del trasplante y la aparición de la nefropatía crónica del injerto posteriormente. Clásicamente la inmunosupresión se basa en el empleo de un anticalcineurínico que puede ser ciclosporina (CsA) o tacrolimus asociado o no a otras drogas (Lorenzo *et al.*, 2002).

### **1.3.1.3 Rechazo al injerto.**

El rechazo agudo continúa siendo la principal causa de fracaso en el trasplante renal de donador cadavérico ocasionando pérdida del injerto en el primer año post-trasplante con una incidencia de 15 a 25% y una sobre vida a 10 años del 50% (Reichelt *et al.*, 2006; Schaub *et al.*, 2003; Martín, *et al.*, 2006; Lorenzo, *et al.*, 2002).

Se produce por la agresión del sistema inmunológico del receptor frente a los antígenos extraños del injerto. Este es lesionado por factores celulares, humorales y otros no totalmente conocidos. Se caracteriza por una alternación brusca de la función del injerto, con otros cambios histológicos específicos.

La función renal es monitoreada post-trasplante comúnmente con el seguimiento de las variaciones de las concentraciones de creatinina en suero, sin embargo, éste es un indicador poco sensible ya que está influenciado por cambios en la masa muscular y la secreción tubular (Lamiere *et al.*, 2005; Hewitt *et al.*, 2004; Oetting *et al.*, 2006; Essawy *et al.*, 2006). Actualmente el diagnóstico de rechazo agudo sólo puede confirmarse a través de la biopsia renal, la cual es un método costoso, invasivo y acarrea el riesgo de complicaciones tales como dolor, hematuria, hematomas, fístulas arteriovenosas, sepsis y shock. Además no puede detectar cambios tempranamente porque la función renal no siempre correlaciona con las alteraciones histológicas. Un error de muestreo es otro problema conocido (Li *et al.*, 2001, Reichelt *et al.*; 2005).

El estudio histológico debe hacerse de acuerdo a la clasificación de Banff, Dicha clasificación es un esquema internacional desarrollado para establecer los parámetros patológicos a considerarse durante la interpretación de una biopsia renal para confirmar o descartar un rechazo agudo. Clásicamente se ha clasificado en: vascular o celular, en un intento de correlacionar los aspectos patogénicos (inmunidad celular o humoral) y morfológicos (afectación túbulo intersticial o vascular) (Racusen, *et al.*, 1999).

En años recientes ha incrementado el interés en la exploración del proteoma urinario humano, particularmente para el establecimiento de mapas que ayuden en el descubrimiento de biomarcadores auxiliares en el diagnóstico de diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades renales (Khan y Packer, 2006; Riordan, *et al.*, 2004).

#### **1.4 Análisis proteómico.**

El proteoma es una colección dinámica de proteínas que demuestran variaciones significativas entre individuos, entre los tipos celulares, y en un mismo individuo bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. La proteómica es el conjunto de herramientas implicadas en el análisis del proteoma (Clarke, 2006).

Se puede decir que hubo tres factores decisivos para el desarrollo de la proteómica: La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas, el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos y los avances realizados en la separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en doble dimensión (2D-PAGE) con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPG's) (<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm#zSDS-PAGE>; Gil, 2003; O'Farrel, 1974). La proteómica ha sido aplicada ampliamente en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de diversas patologías, entre las que se incluyen las cardiovasculares, aparato reproductor femenino y masculino, enfermedades hepáticas y renales, entre otras (O'riordan et al., 2004; Kurgan *et al.*, 2005; Vivanco et al., 2003)

#### **1.4.1 Electroforesis bidimensional.**

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la tecnología más utilizada para la separación de proteínas (Vojtová *et al.*, 2007; Asirvatham *et al.*, 2002).

Para muchas aplicaciones proteómicas, la electroforesis en doble dimensión es el método de elección. Es una técnica reproducible que permite la separación de proteínas de 10 a 300 kDa. Está basada en una separación de las proteínas en función de la carga, seguida de una separación de acuerdo a su masa molecular.



La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque (IEE), durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, por estar en su punto isoeléctrico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante PAGE en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo a su peso molecular. Para la detección de las proteínas ya separadas se emplea la tinción con azul de Coomassie o con plata (García, 2000; Gil, 2003).

La orina es un fluido corporal que se puede obtener de forma no invasiva y que contiene proteínas, péptidos y aminoácidos relacionados al sistema renal que pueden no ser encontrados en el plasma (Khan y Packer, 2006; Lorenzo *et al.*, 2002).

La orina contiene aniones y cationes (sales) que interfieren con métodos semipreparativos como el IEE de proteínas cuando se desea realizar la electroforesis bidimensional, por lo que es necesario eliminarlos.

Es importante concentrar las proteínas de las muestras de orina. Se ha reportado que de la precipitación de 20 mL de orina con AcN, se obtienen aproximadamente 200 mg de proteína de una persona sana.

Se han descrito diferentes métodos de concentración de orina, entre los cuales se encuentra la diálisis, liofilización, filtración, ultrafiltración y la precipitación (Khan y Packer, 2006; Thongboonkerd *et al.*, 2002).

#### **1.4.2 Proteómica en enfermedades renales y trasplante renal.**

Un biomarcador es una característica biológica que es medida y evaluada objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuesta farmacológica a la intervención terapéutica (Hewitt *et al.*, 2004).

Los criterios propuestos para un biomarcador ideal detectados en fluidos como la orina o la sangre son: facilidad de medición, estabilidad en la matriz; sensibilidad, poder ser detectados en el curso agudo de la enfermedad, incluso antes de observar alteración en otros parámetros bioquímicos; especificidad, tener la capacidad de presentarse diferencialmente en patologías semejantes y habilidad predictiva, es decir, que sea útil para detectar la progresión o regresión del padecimiento en observación (Vidal *et al.*, 2005).

En 2004, Shaub y cols. realizaron un estudio utilizando la metodología de ionización realizada por la superficie mediante desorción con láser (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time of Flight-Mass Spectrometry; SELDI-TOF-MS) en el que incluyeron personas sanas, pacientes con trasplante de evolución estable, con rechazo agudo, con necrosis tubular aguda y con glomerulopatía recurrente o *de novo*. Encontraron picos característicos de proteínas urinarias en los espectros de masas en el grupo de pacientes con rechazo agudo.

Posteriormente, Shaub y cols. en 2005 publicaron otro trabajo en el que realizan la detección de las proteínas con SELDI-TOF en un grupo de pacientes con rechazo agudo comparando con el grupo de personas sanas y realizaron la identificación de la proteína utilizando MALDI-TOF. Encontraron la  $\beta$ 2-microglobulina en el grupo de los pacientes trasplantados con rechazo al injerto renal reportándola como potencial marcador de rechazo agudo.

Por otro lado Reichelt y cols. encontraron 2 proteínas características en un grupo de pacientes con rechazo al injerto renal, una de 25.71 kDa y otra de 28.13 kDa, utilizando SELDI-TOF (Reichelt, *et al.*, 2005). Con esta misma metodología O'riordan y cols. reportaron la presencia de siete proteínas específicas (2, 2.8, 4.8, 5.9, 7, 19 y 25.7 kDa) en la orina de un grupo de pacientes que presentaron rechazo al injerto renal con rechazo confirmado por histología de acuerdo a la clasificación de Banff (O'riordan *et al.*, 2004).

Jain y cols. utilizando la electroforesis bidimensional en conjunto con la identificación con MALDI-TOF y análisis de western blot, encontraron que la zinc  $\alpha$ 2 glicoproteína,  $\alpha$ 1 microglobulina,  $\alpha$ 1 glicoproteína ácida e inmunoglobulina G estaban presentes en los pacientes con ND con microalbuminuria, y ausentes en pacientes sin microalbuminuria, (Jain, *et al.*, 2005).

En la tabla 1 se resumen los resultados de algunos de los trabajos en los que se han incluido pacientes con alguna nefropatía donde se ha aplicado la proteómica para la búsqueda de biomarcadores.

Tabla 1. Antecedentes de la aplicación de la proteómica para la búsqueda de biomarcadores en enfermedades renales.

Autores	Metodología	Grupos de estudio	Candidatos a biomarcadores
Schaub et al.; 2005	SELDI-TOF MALDI-TOF-MS	Px. TR rechazo Px. TR estables	$\beta$ - 2 - microglobulina
Reichelt et al.; 2006	SELDI-TOF	Px. TR rechazo Px. TR estables	25.71 kDa 28.13 kDa
Jain et al.; 2005	2D - MALDI-TOF	Px. DM II con MA Px. DM II sin MA	$\alpha$ 2 glicoproteína $\alpha$ 1 microglobulina $\alpha$ 1 glicoproteína ácida, IgG
O'riordan et al., 2004	SELDI-TOF	Px. TR rechazo Px. TR estables	2, 2.8, 4.8, 5.9, 7, 19 y 25.7 kDa
Clarke et al.; 2003	SELDI-TOF	Px. TR estables Px. TR rechazo	6.5 kDa, 6.6 kDa, 6.7 Da 7.1 kDa, 13.4 kDa
Kumar et al.; 2002	2D - MALDI-TOF	Falla renal (FR), Síndrome nefrótico (SN), microalbuminuria (MA)	FR albúmina, $\alpha$ - 1- antitripsina SN $\alpha$ - 1 - antitripsina, $\alpha$ - 1 - glicoproteína ácida 2, $\alpha$ - 2 - glicoproteína MA $\alpha$ - 2 - glicoproteína $\alpha$ - 1 - microglobulina $\alpha$ - 1 - glicoproteína ácida

## **1.5 Justificación.**

El monitoreo de los pacientes que han sido trasplantados es importante, ya que tiene la finalidad de prevenir oportunamente un rechazo al injerto para, de ser necesario, modificar la terapia inmunosupresora, así como diagnosticar acertadamente las nefropatías más recurrentes, mediante el uso de pruebas no invasivas.

La electroforesis bidimensional de proteínas es una herramienta de la proteómica que permite establecer los perfiles de expresión de proteínas característicos en diferentes condiciones fisiopatológicas, por lo tanto podría ser útil en el monitoreo de la evolución del paciente con trasplante renal.

## **1.6 Objetivo general.**

Desarrollar un método de electroforesis bidimensional para la detección de proteínas en orina que sea útil para el diagnóstico diferencial de nefropatías.

## **1.7 Objetivos específicos.**

1. Establecer mediante parámetros bioquímicos las características de las diversas nefropatías de estudio.
2. Establecer las condiciones óptimas de extracción de proteínas (pretratamiento) y desarrollar el método electroforético.
3. Validar el método de electroforesis bidimensional de proteínas en orina.
4. Verificar si existen diferentes perfiles de expresión proteica entre los grupos de estudio.

**CAPÍTULO 2****MATERIAL Y MÉTODOS****2.1 MATERIAL.****2.1.1 Pacientes incluidos en el estudio.**

En este estudio se incluyeron pacientes que acudieron a la consulta de nefrología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y a pacientes que fueron sometidos a trasplante de riñón durante el periodo Junio de 2006 a Junio de 2008, a los cuales se les invitó a participar en el protocolo de investigación. Cada grupo de estudio estuvo conformado por cinco pacientes que cumplieran los criterios de inclusión particulares.

**2.1.1.1 Criterios de inclusión generales.**

- ✓ Ser mayores de 18 años.
- ✓ Carta de consentimiento informado firmado por el paciente y un testigo (Anexo 7.1).

#### **2.1.1.2 Grupos de estudio y criterios de inclusión particulares.**

- ✓ Grupo de pacientes con nefropatía diabética de acuerdo a diagnóstico de nefrólogo y que no haya iniciado tratamiento sustitutivo.
- ✓ Grupo de pacientes con trasplante renal de evolución estable, parámetros serológicos normales y sin recurrencia de nefropatía de base.
- ✓ Grupo de pacientes con trasplante renal con rechazo agudo, detectado por elevación de creatinina y confirmado por biopsia.

#### **2.1.1.3 Criterios de exclusión.**

- ❖ Menores de 18 años.
- ❖ No cumplieron con alguno de los criterios de inclusión.
- ❖ No estuvieron de acuerdo en colaborar en el protocolo.

#### **2.1.1.4 Seguimiento de la evolución del paciente.**

A los pacientes del grupo de trasplante de evolución estable y los que presentaron rechazo se les realizó un seguimiento clínico por parte del equipo de médicos y un seguimiento de los parámetros bioquímicos para el cual se realizó la recolección de sangre y orina a los 7, 15 y 30 días post trasplante. Adicional a estas tomas, en los pacientes que presentaron rechazo se les realizó la recolección de muestras de sangre y orina previa a la biopsia. Para ello se mantuvo constante comunicación con nefrólogos y cirujanos de



cabecera de los pacientes en seguimiento. A los pacientes del grupo de nefropatía diabética se les realizó una toma única.

### **2.1.2 Reactivos.**

- Aceite mineral
- Acetona
- Acrilamida grado biología molecular, Amresco
- Agarosa grado biología molecular, Amresco
- Agua milliQ
- Azul de Bromofenol
- Azul de Coomassie brillante G-250
- Buffer IPG pH 3 – 10, Amersham
- Calibradores de pI, Amersham (tripsinógeno PM = 24; pI = 9.3)
- CHAPS
- Cóctel inhibidor de proteasas M221, Amresco
- DL – Ditiotretitol (DTT)
- Etanol 70%
- Glicerina
- Glicerol 87%
- Iodoacetamida (IAA)
- Kit calibradores de punto Isoeléctrico pH 3 – 10, Amersham

- Kit de Cuantificación “2D Quant kit”, Amersham
- Kit de Eliminación de albúmina “Montage Albumin Deplete kit”, Millipore
- Kit de Limpieza “Clean up Kit”, Amersham
- Marcador de peso molecular (MPM) Mark12 unstained Standard, Invitrogen
- N, N, N', N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED), Amresco
- Persulfato de amonio
- Solución fisiológica cloruro de sodio (NaCl) 0.9%
- Tiras de pH inmovilizado de 7 cm, rango pH 3 – 10, Amersham
- Buffer TRIS
- Urea

#### **2.1.2.1 Preparación de reactivos**

La preparación de reactivos utilizados en el presente estudio se describen en el anexo 7.2.

#### **2.1.3 Material general.**

- Agujas estériles para extracción de muestras de sangre, Vacutainer
- Adaptadores para aguja de extracción de muestras de sangre, Vacutainer

- Algodón
- Gradillas
- Pinzas para tiras de IPG
- Pipetas serológicas 10 mL
- Pipetas semiautomáticas de volumen variable Rainin p10, p20, p100, p200 y p1,000.
- Puntillas para pipeta automática de volumen variable p-100, p-200 y p-10 y p-2
- Soportes para agujas de recolección de muestras de sangre, Vacutainer
- Tubos de vidrio 13 x 100mm
- Tubos de ultrafiltración Centricon ultracel YM-10, Millipore
- Tubos para microcentrífuga, Eppendorf
- Tubos estériles para recolección de muestras con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Vacutainer
- Vasos para recolección de muestras de orina

### **2.1.3 Equipos.**

- Placa de agitación modelo 22406A, Daigger.
- Cámaras de electroforesis vertical miniPROTEAN, BioRad.
- Cell Dyn 1700, Abbott Diagnostics
- Centrífuga modelo J-600, SOL-BAT

- Centrífuga refrigerada Allegra X-22R Beckman Coulter
- Digitalizador ImageScanner II, Amersham
- Equipo para isoelectroenfoque iProtean IEF, BioRad
- Equipo milliQ, Millipore
- Espectrofotómetro de longitud de onda variable Jenway 6320D.
- Fuente de poder EC105, Termo electro corp.
- Microcentrífuga Sorvall-pico, Kendro
- Micropipetas automáticas de volumen variable
- Plancha de agitación
- Refrigerador Tor-rey (0 – 4°C)
- Congelador REVCO (-20°C)
- Ultracongelador (-70°)
- Vitros DT60II System Chemistry módulo central y módulo DTSC II, Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Co.

#### **2.1.4.1 Software de análisis de datos.**

- LabScan versión 5.0, Amersham Biosciences
- ImageMaster 2D Platinum, Amersham Biosciences
- Excel, Microsoft Office XP

## **2.2 MÉTODOS.**

### **2.2.1 Revisión de expedientes clínicos.**

Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes, para obtener datos como la diuresis de los pacientes incluidos en los tres grupos de estudio; proteínas en orina de 24 h y depuración de creatinina en el caso de los pacientes con nefropatía diabética; además, se corroboró el tipo de rechazo en el resultado histológico de los pacientes con rechazo al injerto realizado por el patólogo.

Para el grupo de pacientes trasplantados con evolución estable los datos utilizados fueron los resultados correspondientes al día siete post-trasplante, para los pacientes con rechazo se tomaron los del día del episodio de rechazo y para los pacientes del grupo de ND se tomaron los resultados correspondientes al día de la toma de muestras.

### **2.2.2 Obtención de sangre periférica y de catéter central.**

Se utilizaron las técnicas convencionales de extracción.

### **2.2.3 Obtención de suero a partir de las muestras de sangre.**

Se utilizó la técnica convencional de obtención de suero a partir de sangre coagulada y se almacenó en 3 alícuotas de 1 mL a -20°C hasta su uso.

#### **2.2.4 Recolección y preparación de muestras de orina.**

Se utilizó la técnica convencional de obtención de orina de una micción o se tomó de la bolsa de la sonda y se almacenó en 6 alícuotas de 4 mL a -70°C hasta su uso.

#### **2.2.5 Determinación de parámetros bioquímicos en suero.**

Las pruebas serológicas determinadas fueron creatinina y glucosa, se realizaron en el equipo Vitros DT60 II Chemistry System (módulo central y módulo DTSC II, Johnson & Johnson Co., el cual es un sistema semiautomático de química seca.

##### **2.2.5.1 Determinación de glucosa en suero.**

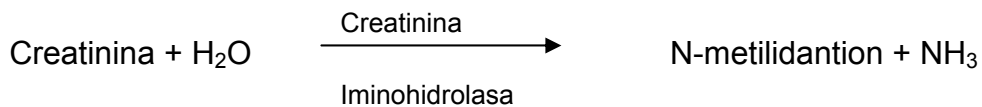
La determinación se basó en la reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa donde la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno molecular, ocurre una segunda reacción donde se produce una coloración en la laminilla.



El equipo mide la luz reflectada por el color producido por la reacción después de un periodo de incubación. El equipo calcula la concentración de glucosa de la muestra (Manual Vitros DTII). Para el procesamiento de las muestras se siguió el procedimiento estándar.

#### **2.2.5.2 Determinación de creatinina en suero.**

La determinación se basó en la hidrólisis enzimática de la creatinina para la producción de amonio. El amonio reacciona con un indicador de la laminilla que produce un color azul. Las reacciones que se llevaron a cabo son las siguientes:

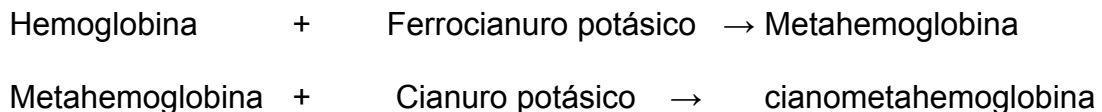


El equipo mide la luz reflectada por el color producido por la reacción después de un periodo de incubación. El equipo calculó la concentración de creatinina de la muestra (Manual Vitros DTII). Para el procesamiento de las muestras se siguió el procedimiento estándar de acuerdo al manual de operación del equipo.

### **2.2.5.3 Determinación de Hemoglobina en sangre total.**

Para realizar la determinación de hemoglobina se hizo la biometría hemática utilizando las muestras de sangre colectadas en los tubos con EDTA.

Se utilizó el equipo Cell Dyn 1700, Abbott. La determinación se fundamenta en la conversión de la hemoglobina a cianmetahemoglobina, la cual es cuantificada midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (Manual de Cell-Dyn; Vives y Aguilar, 2006). Las reacciones que se llevan a cabo en la determinación son las siguientes:



Para el procesamiento de las muestras se siguió el procedimiento estándar de acuerdo al manual de operación del equipo (Manual de Cell-Dyn).

### **2.2.6 Precitación de proteínas de orina.**

1. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra de orina en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Se agregó a cada muestra 1  $\mu\text{L}$  de cocktail inhibidor de proteasas
3. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de acetona previamente enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Se dejó en incubación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche (12 – 16 h).



5. Se centrifugó a 20 °C durante 20 min. a 3500 rpm.
6. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de proteínas.
7. Se resuspendió en 100 µL de agua milliQ.

### **2.2.7 Limpieza de muestras de orina.**

Se utilizó el kit 2D Clean Up de Amersham, el cual se basa en la limpieza de la muestra por la precipitación de las proteínas y la eliminación de las interferencias que se quedan contenidas en el sobrenadante.

Procedimiento:

1. Se tomaron 100 µL de muestra de orina
2. Se agregaron 300 µL de reactivo precipitante y se agitó con vortex y se incubó en hielo durante 30 min.
3. Se agregaron 300 µL de reactivo coprecipitante y se agitó con vortex.
4. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min.
5. Se eliminó sobrenadante.
6. Se agregaron 40 µL de reactivo coprecipitante y se incubó en hielo durante 5 min.
7. Se centrifugó 5 min. y se eliminó sobrenadante.
8. Se agregaron 25 µL de agua milliQ y se agitó con vortex durante 5 segundos.

9. Se agregó 1 mL buffer de lavado previamente incubado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $5\ \mu\text{L}$  de aditivo de lavado y se mezcló.
10. Se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min., mezclando cada 10 min.
11. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min.
12. Se removió sobrenadante.
13. Se resuspendió la muestra con  $100\ \mu\text{L}$  de agua milliQ.

### 2.2.8 Concentración de muestras de orina por ultracentrifugación.

La concentración se logró por ultracentrifugación de las muestras utilizando filtros comerciales (Ultracel centricon 10kDa, Millipore).

La concentración se logra cuando se realiza la ultrafiltración de la solución de las muestras a través de las membranas de celulosa regenerada contenido en el vial de filtración, las moléculas mas pequeñas son forzadas a pasar a través del filtro reteniendo las moléculas que son de mayor tamaño con respecto al tamaño de la membrana. (Inserto Centricon® Centrifugal Filter Devices)

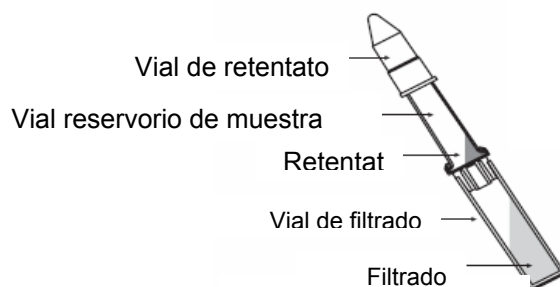


Figura 2. Filtro Ultracel Centricon

Procedimiento:

1. Se colocaron en el vial reservorio de muestra 2 mL de muestra de orina.
2. Se centrifugó a 9500 rpm en una ultracentrífuga refrigerada a 20 °C durante 50 min.
3. Se agregaron 2 mL adicionales de muestra de orina.
4. Se centrifugó nuevamente a 9500 rpm hasta obtener 200 µL de muestra en el vial reservorio de muestra.
5. Se colocó el vial del retentato y se invirtió el vial reservorio de muestra.
6. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min. para recuperar el retentato.
7. Se colocaron 2 µL de inhibidor de proteasas (1:100= inhibidor: muestra).
8. Se mantuvo en congelación a -70 °C hasta su procesamiento.

### **2.2.9 Eliminación de albúmina en orina.**

Para la eliminación de albúmina de las muestras de orina se utilizó el kit Montage Albumin Deplete, Millipore dentro del cual se utiliza una columna preempacada con una resina que ha sido formulada especialmente para su unión con albúmina y sin unión significativa a otras proteínas. El procedimiento consistió en hacer eluir la muestra a través de la columna previamente equilibrada, posteriormente se lavó para reducir las uniones inespecíficas de la resina con proteínas diferentes a la albúmina y se recuperaron los eluatos que contienen el resto de las proteínas (Inserto Montage Albumin Deplete kit, Millipore). (Figura 3)

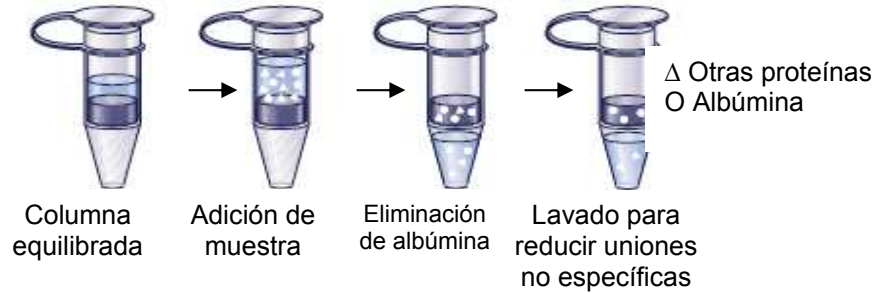


Figura 3. Procedimiento de eliminación de Albúmina

Procedimiento:

### 2.2.9.1 Dilución de la muestra

1. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de buffer de equilibrio.
2. Se colocó muestra diluida en columna equilibrada.

### 2.2.9.2 Equilibrio de la columna

1. Se colocaron en la parte superior de la columna 400  $\mu\text{L}$  de buffer de equilibrio
2. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min. y se descartó eluato de tubo colector.
3. Se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de buffer de equilibrio nuevamente.
4. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min. una vez más y se descartó el eluato.

### 2.2.9.3 Depleción de albúmina y lavado de columna

1. Se colocó la muestra en la columna la muestra previamente preparada.

2. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min.
3. Se recuperó el eluato de tubo colector y se volvió a agregar nuevamente a la columna.
4. Se centrifugó nuevamente a 2,000 rpm durante 2 min.
5. Se recuperó el eluato y se colocó en un tubo de plástico.
6. Se agregaron 200  $\mu$ L de buffer de lavado.
7. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min.
8. Se agregaron 200  $\mu$ L más de buffer de lavado.
9. Se colocó el eluato del tubo colector con la solución obtenida en el paso No. 5
10. El volumen final de este procedimiento fue de 600  $\mu$ L

#### **2.2.10 Precipitación de proteínas posterior a eliminación de albúmina.**

1. Se colocaron 600  $\mu$ L de la muestra obtenida de la eliminación de albúmina.
2. Se agregaron 3 mL de acetona previamente enfriada a -20 °C.
3. Se dejó en incubación a -20 °C durante toda la noche (12 – 16 h).
4. Se centrifugó a 20 °C durante 20 min. a 3500 rpm.
5. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de proteínas.
6. Se resuspendió cada muestra en 200  $\mu$ L de agua milliQ.

### **2.2.11 Cuantificación de proteínas.**

Para realizar la determinación de las proteínas se utilizó el kit comercial 2D-Quant, Amersham. El ensayo incluye la precipitación de las proteínas para la eliminación de sustancias que pudieran interferir en la cuantificación. La cuantificación de las proteínas se basa en la unión específica de las proteínas con iones de cobre. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de las proteínas por lo que se obtuvo una pendiente negativa.

El ensayo tiene una respuesta lineal en un rango de proteínas de 0 a 50  $\mu\text{g}$  (Inserto 2D Quant, Amersham). La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo por duplicado en muestras y estándares.

Procedimiento:

1. Se elaboró una curva de calibración de proteínas en cada determinación de la siguiente manera:
  - a. Se prepararon 6 estándares de 0, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}$  añadiendo 0, 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{L}$  de estándar de albúmina 2 mg/mL
2. A cada muestra o estándar se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de reactivo precipitante y se mezcló con vortex y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 3 min.
3. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de reactivo precipitante y se mezcla por agitación
4. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min.

5. Inmediatamente después de la centrifugación, se removió sobrenadante.
6. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución de cobre y 400  $\mu$ L de agua destilada y se mezcló para disolver el botón de proteínas que se precipitó.
7. Se agregó 1 mL de reactivo de color preparado antes de la determinación mezclando reactivo A y reactivo B en una proporción 100:1.
8. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 min.
9. Se leyó la absorbancia a 480 nm y se registraron los resultados.
10. Se graficaron las lecturas obtenidas de los estándares. Considerando una curva de calibración aceptable cuando se obtuviera un coeficiente de determinación  $\geq 0.995$ .
11. Se calculó la concentración de las muestras a partir de la ecuación de la recta.

#### **2.2.12 Rehidratación de tiras de IPG.**

Se utilizaron tiras de pH inmovilizado de 7 cm de longitud y con un gradiente de pH 3 – 10. Las muestras fueron incorporadas a las tiras a través de un buffer de rehidratación.

Procedimiento:

1. Se colocó un volumen de muestra equivalente a 150  $\mu$ g de proteína en un tubo Eppendorf.

2. Se agregó el volumen equivalente a 20  $\mu\text{g}$  de calibrador (tripsinógeno pl 9.3 y PM 24 kDa).
3. Se completó a un volumen de 125  $\mu\text{L}$  con el buffer de rehidratación.
4. Se colocaron las muestras en cada carril de la placa de rehidratación sobre una superficie nivelada.
5. Se retiró el plástico protector del lado de la tira que tiene adherido el IPG.
6. Se colocaron las tiras sobre las muestras con la cara con el gel hacia abajo (hacia la muestra).
7. Se dejaron incubando las tiras con la muestra durante una hora a temperatura ambiente.
8. Se cubrieron las tiras con aceite mineral, dejando en rehidratación durante 12h.
9. Transcurrido el tiempo, las tiras se retiraron del aceite mineral y se escurrieron.

### **2.2.13 Isoelectroenfoco.**

Se realizó en el equipo Protean IEF de BioRad. Éste consistió en la separación de las proteínas dentro de un gradiente de pH inmovilizado de acuerdo a su punto isoeléctrico al estar bajo la influencia de un campo eléctrico (Berkelman y Stenstedt; 1998; O'Farrel, 1975).



Las condiciones del isoelectroenfoque fueron las siguientes:

Paso 1. Voltaje de 250 V durante 20 min. con rampa en modo lineal.

Paso 2. Voltaje de 4,000 V durante 2 h con rampa en modo lineal.

Paso 3. Voltaje inicial de 4,000 V con rampa en modo rápido hasta llegar a 10,000 V-h

Procedimiento:

1. Se le colocaron a la placa de isoelectroenfoque pequeños trozos de papel humedecidos con agua milliQ sobre los electrodos.
2. Se colocaron las tiras de IPG con el gel hacia abajo en la cámara de isoelectroenfoque.
3. Se cubrieron todos los carriles de la cámara de isoelectroenfoque con aceite mineral.
4. Se introdujeron al equipo las condiciones de isoelectroenfoque y se dio marcha, el tiempo total fue aproximadamente de 5 horas.
5. Terminando la separación, las tiras se retiraron de la cámara de isoelectroenfoque, se escurrieron y se procedió a realizar el equilibrio.

#### **2.2.14 Equilibrio de tiras de IPG.**

En este procedimiento se realizó la saturación de la tira de IPG que contiene la muestra con un buffer de SDS requerido para la separación en segunda dimensión.

Esto con el objetivo desnaturalizar proteínas y formar complejos de proteína-SDS cargados negativamente, la cantidad de SDS unido a las proteínas y en consecuencia, la carga adicionada, es directamente proporcional a la masa de las proteínas (Berkelman y Stenstedt, 1998).

Procedimiento:

1. Se colocaron en una placa de rehidratación las tiras de IPG con la cara del gel hacia arriba.
2. Se le agregaron 1.5 mL de buffer de equilibrio con DTT y se mantuvieron en agitación durante 15 min.
3. Se eliminó el buffer de equilibrio.
4. Se adicionaron 1.5 mL de buffer de equilibrio con IAA y se mantuvieron en agitación durante 15 min.
5. Se eliminó buffer de equilibrio.
6. Se hicieron 3 lavados por inmersión de las tiras en agua milliQ.

### **2.2.15 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de sodio (SDS-PAGE).**

La SDS-PAGE es un método electroforético para la separación de polipéptidos de acuerdo a su peso molecular. Se realizó en un equipo Mini-PROTEAN de BioRad a un voltaje constante de 100 V.

Procedimiento:

1. Se prepararon los geles utilizando vidrios de un grosor de 1mm utilizando SDS-PAGE al 12%.
2. Se colocaron las tiras en la parte superior de los geles solidificados y fríos contenidos en la cámara de electroforesis vertical, con la cara del gel hacia el vidrio más grande y con el extremo positivo de la tira hacia el lado izquierdo de la cámara.
3. Se revisó que no hubiera burbujas entre el gel y el vidrio. Se colocó un separador en el extremo izquierdo de la cámara junto a la tira.
4. Se sellaron las tiras con solución de agarosa y se esperó a que solidificara la agarosa.
5. Se retiró el separador y se llenó la cámara de electroforesis en la parte interna y externa con buffer de corrida 1x.
6. Se colocaron 10  $\mu$ L de MPM en el espacio generado por el separador.
7. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis con los polos hacia el lado correspondiente
8. Se encendió la fuente de poder ajustando a un voltaje constante de 100V.
9. Se dejó correr la electroforesis en cuarto frío durante aproximadamente 1h 45 min. o hasta que la línea de migración de azul de bromofenol se observó a 1 cm del final del gel y se apagó la fuente de poder.

### **2.2.16 Tinción – destinción de geles.**

1. Se retiraron los geles de la cámara.
2. Se hizo un pequeño corte en la esquina superior del extremo negativo de acuerdo a la colocación de la tira de isoelectroenfoco.
3. Se colocaron en un recipiente.
4. Se agregó solución de tinción de azul de Coomassie hasta cubrirlos totalmente y se mantuvieron en agitación durante 10 min.
5. Se retiró la solución de tinción.
6. Se agregó solución de destinción hasta cubrirlos totalmente y se mantuvieron en agitación durante 10 min.
7. Se desechó la solución de destinción.
8. Se repitieron los pasos de tinción – destinción.
9. Después de la segunda destinción, se colocó nuevamente solución de destinción y se mantuvieron los geles en agitación durante 30 min.
10. Se desechó la solución de destinción
11. Se colocó solución de destinción una vez más y se mantuvieron los geles sin agitación y en refrigeración durante 12 h antes de ser digitalizados.

### **2.2.17 Digitalización de geles.**

Para la digitalización de los geles se utilizó el equipo ImageScanner II, Amersham con el programa LabScan.

El equipo cuenta con un densitómetro con la cual mide la intensidad de las manchas de los geles digitalizados considerando la densidad óptica. La digitalización se realizó con una resolución de 300 dpi con filtro verde para geles teñidos con azul de Coomassie. Los archivos de las imágenes se almacenaron en formato TIFF y mel.

### **2.2.18 Análisis de imágenes de geles.**

Para el análisis de las imágenes de los geles se utilizó en programa Image Master™ 2D Platinum de Amersham, se realizó el comparativo de las manchas por paciente y por grupo por presencia/ ausencia de manchas. Para el análisis de las imágenes se realizó la detección, edición y reporte de manchas e introducción de datos complementarios, se hizo de acuerdo al manual de operación del equipo.

#### **2.2.18.1 Introducción de datos complementarios.**

Para que el software realizara el reporte detallado de pI y pM de las manchas detectadas fue necesario introducir valores de pI y pM de algunas de las manchas presentes en la muestra, tomando en cuenta la migración del MPM, y la escala de pI distribuida en el gel y el calibrador de pI adicionado a la muestra.

### **2.2.18.2 Validación del método electroforético.**

En el reporte de los 15 geles a los cuales se les adicionó el calibrador, se buscó la mancha que correspondiera al calibrador de pl y PM adicionado. Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de pl y PM utilizando el programa Excel para calcular la precisión del método para el cálculo de pl y PM considerando como aceptable un  $CV \leq 5\%$ .

Para verificar la exactitud del método para el cálculo de pl y PM se utilizó la misma información y se aplicó la prueba t de Student con el programa Excel.

### **2.2.18.3 Empalme de imágenes e identificación de manchas características.**

Se des-seleccionaron las manchas y se identificó visualmente una mancha presente en las imágenes de los geles a empalmar, primero por paciente, después por grupo. Se verificó el resultado del empalme de los geles sobreponiéndolos y visualizándolo de acuerdo al manual de operación del programa. Se seleccionaron los tres geles de un mismo paciente y se solicitó al programa la emisión del reporte de pares. En dicho reporte presentó el No. de identificación de la mancha y en los geles en los cuales se presentó. Se consideraron como manchas características las que estuvieran presentes en al menos dos de los tres geles por paciente.

Posteriormente se buscaron las manchas características de cada grupo, seleccionando aquellas que resultaron características de cada paciente y solicitando al software la emisión del reporte de pares. Se consideraron como características del grupo aquellas que estuvieran presentes en al menos tres de los cinco pacientes. Se realizó el mismo procedimiento para cada grupo de estudio. Se revisó cuales proteínas eran características de cada grupo y que a su vez no estuvieran presentes en los otros grupos de estudio.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### **3.1 Establecimiento mediante parámetros bioquímicos de las características de las diversas nefropatías de estudio.**

##### **3.1.1 Pacientes incluidos en el estudio.**

En el periodo de junio de 2006 a junio de 2008 se realizaron en el Hospital “Dr. José Eleuterio González” 39 trasplantes de riñón de donador cadavérico, de los cuales 32 aceptaron participar en el protocolo y cumplían los criterios de inclusión. Se les dio un seguimiento a un mes post-trasplante y 5 de los pacientes presentaron rechazo agudo al injerto confirmado con el análisis histológico de acuerdo a la clasificación de Banff.

Las variables demográficas de los pacientes incluidos en el proyecto se muestran en la tabla 2.



Tabla 2. Variables demográficas de los pacientes en cada grupo de estudio.

Variables demográficas	Grupos de estudio		
	Grupo Trasplante estable (n=5)	Grupo Trasplante con rechazo	Grupo Nefropatía diabética
Edad (años)	40 ± 5	55 ± 8	65 ± 10
Sexo (F/M)	3/2	2/3	2/3

F= Femenino; M = Masculino

### 3.1.2 Parámetros bioquímicos determinados y consultados en expediente clínico.

Los grupos de estudio se formaron de acuerdo a la evolución clínica, en el caso de los pacientes trasplantados de acuerdo a la revisión clínica de la Dra. Concepción Sánchez, nefróloga de la Unidad Renal y el Dr. Miguel Escobedo, Jefe de la Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, se consideraron los parámetros de evaluación como son la elevación de la creatinina, la diuresis y el análisis histológico.

En el caso de los pacientes con ND se consideró la evaluación del nefrólogo, además de los resultados de proteínas en orina y la depuración de creatinina para catalogarlo con dicho padecimiento.

En la tabla 3 se muestran los parámetros bioquímicos de los grupos de estudio.

Tabla 3. Parámetros bioquímicos de los grupos de estudio

Parámetros bioquímicos	Grupos de estudio		
	Grupo trasplante estable	Grupo trasplante con rechazo	Grupo Nefropatía Diabética
Creatinina (mg/dL)	1.1 ± 0.1	5.7 ± 4.4	2.7 ± 0.9
Glucosa (mg/dL)	84 ± 14.1	150.5 ± 99	119.3 ± 47.1
Hb (g/dL)	10.4 ± 0.8	8.3 ± 0.5	10.5 ± 0.4
Diuresis (mL/24h)	3500 ± 1216	1580 ± 610	1628 ± 572
Proteína en orina (g/24h)	N. A.	N. A.	16.6 ± 2.3
Depuración de creatinina (mL/min.)	N. A.	N. A.	27.5 ± 18.3

Dependiendo de los resultados de laboratorio, el grupo de médicos integrado por el Dr. Miguel Escobedo, la Dra. Concepción Sánchez y cols., tomaron la decisión de realizar la toma de biopsia del aloinjerto renal, en aquellos pacientes en los que se sospecho de un episodio de rechazo.

Los resultados histológicos de los pacientes fueron emitidos por el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” bajo la revisión de la Dra. Gabriela Alarcón.

En los cinco pacientes se confirmó el rechazo agudo, tres de ellos Banff 1 (60%), un paciente fue Banff 2 (20%) y otro Banff 3 (20%). A otros tres pacientes se les tomó biopsia, ya que por sus parámetros bioquímicos se sospechó de rechazo, sin embargo los resultados histológicos no lo confirmaron. El grupo de pacientes con nefropatía diabética presentaron proteinuria con  $16.6 \pm 2.3$  g/24h, siendo el valor de referencia menor a 0.13g/24h, depuración de creatinina de  $27.5 \pm 18.3$  mL/min., siendo el valor de referencia superior a 60 mL/min. y una glicemia de  $119.3 \pm 47.1$  mg/dL, siendo el valor de referencia inferior a 110 mg/dL. Esta información, además de su historia clínica confirmó a estos pacientes con el padecimiento con el cual fueron catalogados en este grupo de estudio.

### **3.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción de proteínas (pretratamiento) y desarrollo del método electroforético.**

Para cumplir con el objetivo 2 se evaluaron cuatro alternativas de pretratamiento:

1. Precipitación con acetona.
2. Limpieza y precipitación.
3. Eliminación de albúmina – precipitación.
4. Concentración por filtración – eliminación de albúmina – precipitación.

A las muestras obtenidas se les realizó la cuantificación, isoelectroenfoque, SDS-PAGE y tinción – destinción de los geles obtenidos. Cada alternativa de pretratamiento de realizó por triplicado.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la cuantificación de las proteínas en las muestras después de cada uno de las alternativas de pretratamiento.

Tabla 4. Concentración de proteínas después del pretratamiento

Pretratamiento	Precipitación con acetona	Limpieza y precipitación con acetona	Eliminación de albúmina y precipitación con acetona	Concentración por ultrafiltración – eliminación de albúmina – precipitación con acetona
Concentración de proteínas (µg/100 µL)	65.7 ± 0.7	64.6 ± 0.9	11.1 ± 0.3	100 ± 0.03

### 3.2.1 Pretratamiento por precipitación con acetona

El método aplicado fue el que se presentó en la sección 2.2.7. Un gel obtenido siguiendo este pretratamiento se muestra en la figura 4.

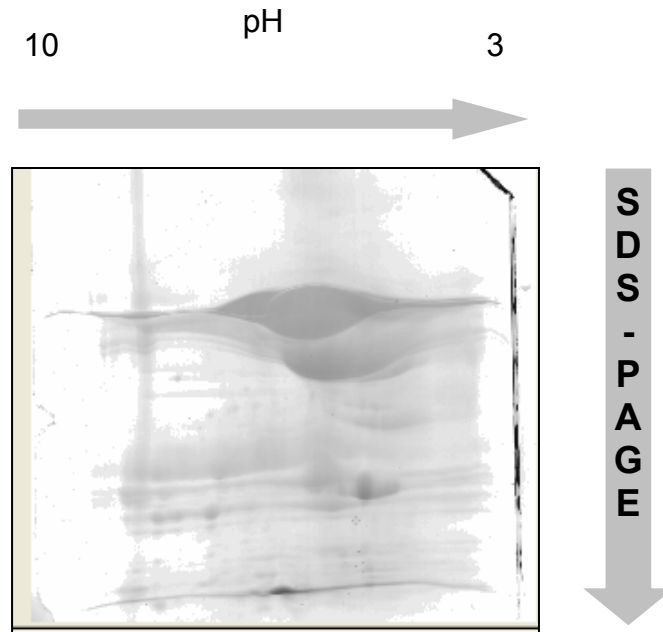


Figura 4. Gel de muestra con pretratamiento por precipitación con acetona

Los geles obtenidos siguiendo éste pretratamiento no presentaron buena resolución, además presentaron una o dos proteínas muy abundantes que pudieran estar enmascarando la presencia de otras proteínas presentes en menor concentración.

Debido a la baja resolución de las manchas se descartó para emplearlo con las muestras antes del análisis definitivo de las muestras de los pacientes incluidos en este estudio.

### **3.2.2 Limpieza y precipitación con acetona.**

Las muestras fueron pretratadas con el método presentado en las secciones 2.2.8 y 2.2.7. Un gel representativo de una de las muestras que se trató

previamente con estos métodos antes de realizar la electroforesis bidimensional se presenta en la figura 5.

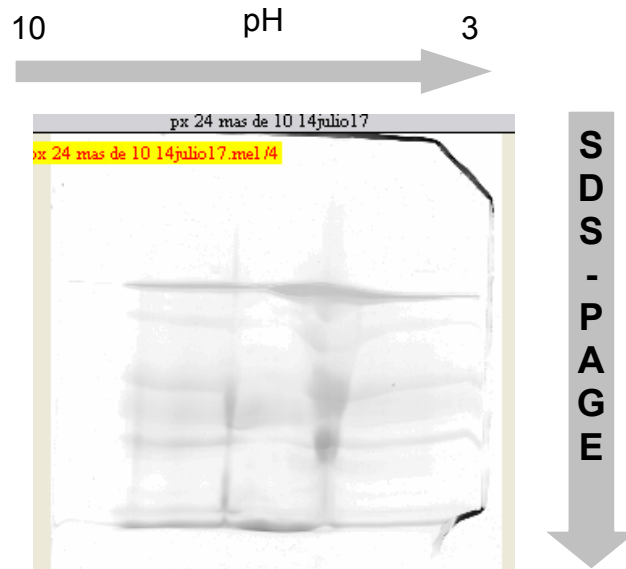


Figura 5. Gel de muestra con pretratamiento por limpieza y precipitación con acetona.

A igual que el pretratamiento anterior, los geles obtenidos siguiendo éste pretratamiento no presentaron resolución de manchas. Se siguió observando una mancha grande que no logró resolverse. También este método fue descartado para emplearlo con las muestras antes del análisis definitivo.

### 3.2.3 Eliminación de albúmina y precipitación con acetona.

Se siguió el método presentado en las secciones 2.2.10 y 2.2.11. La concentración final obtenida de proteínas de las muestras, fue la cantidad mínima recomendada para la tinción con azul de Coomassie, de acuerdo al tamaño de tira de IPG que se utilizó en este trabajo, por lo que se decidió no realizar la electroforesis bidimensional (Berkelman y Stenstedt, 1998).

### 3.2.4 Concentración por ultrafiltración – eliminación de albúmina – precipitación con acetona.

Se siguió el método que fue presentado en las secciones 2.2.9, 2.2.10 y 2.2.11. Un gel representativo de una de las muestras que se trató previamente con estos métodos antes de realizar la electroforesis bidimensional se presenta en la figura 6.

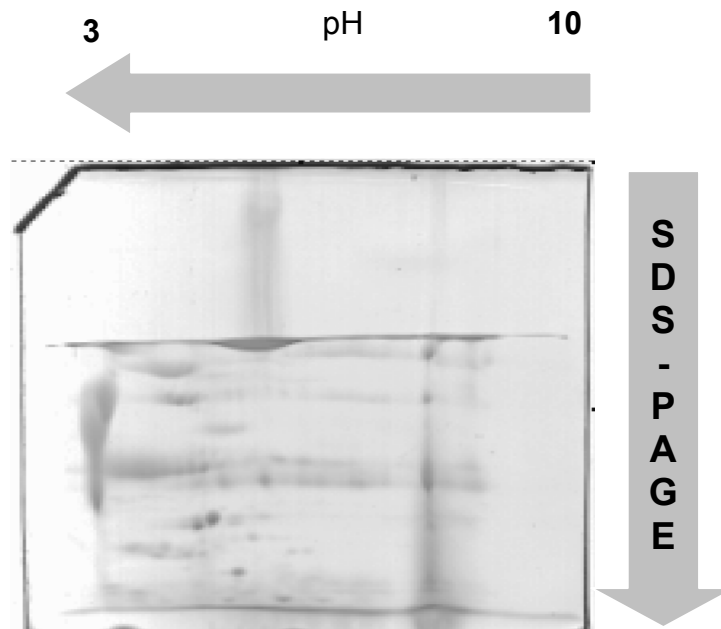


Figura 6. Gel en donde se presenta un ejemplo de muestra con pretratamiento por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona; 100 µg de proteína.

Con el presente pretratamiento se pudo apreciar una mayor diversidad de las manchas presentes en la muestra, sin embargo la definición e intensidad de las mismas aun no se consideró suficiente, por lo que se aumentó la concentración de proteína añadida de 100  $\mu\text{g}$  a 150  $\mu\text{g}$ .

En la figura 7 se presenta un gel en el que se agregaron 150  $\mu\text{g}$  de proteína para verificar si con ello aumentaba la intensidad y visibilidad de las manchas en la muestra.

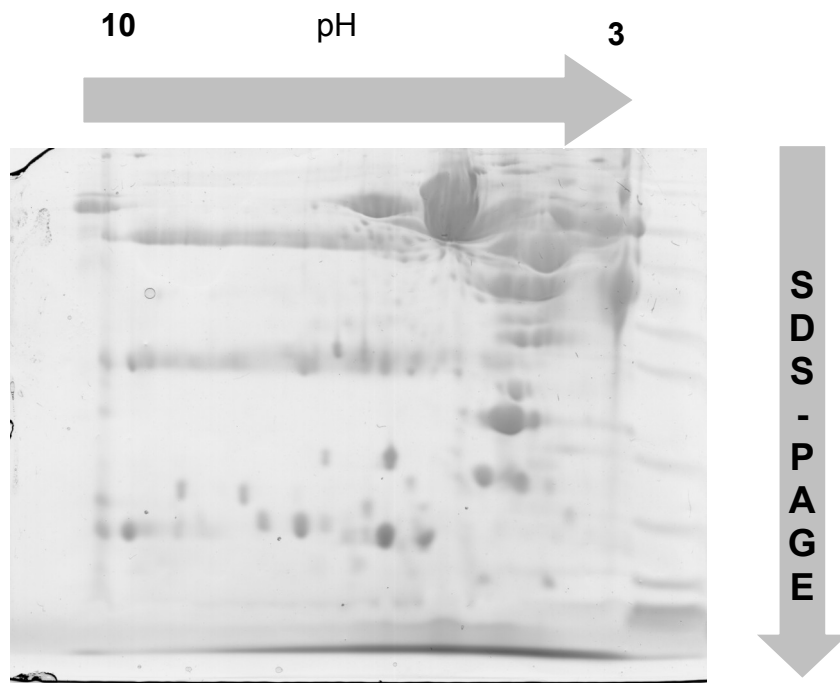


Figura 7. Gel de muestra con pretratamiento por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona; 150  $\mu\text{g}$  de proteína.



Utilizando 150 µg de proteína se pudieron observar con mayor intensidad las manchas, además de apreciarse mejor la diversidad de las mismas, por lo tanto, el método de pretratamiento que consistió en la concentración por ultrafiltración, eliminación de albúmina y precipitación con acetona fue el que se utilizó para procesar todas las muestras incluidas en este proyecto para todos los grupos de estudio.

### 3.2.5 Geles característicos de los grupos de estudio.

En la figura 8 se presenta un gel bidimensional representativo del grupo de pacientes con nefropatía diabética. Se puede apreciar que las manchas con PM abajo de 25 kDa se lograron resolver mejor que las manchas de mayor PM.

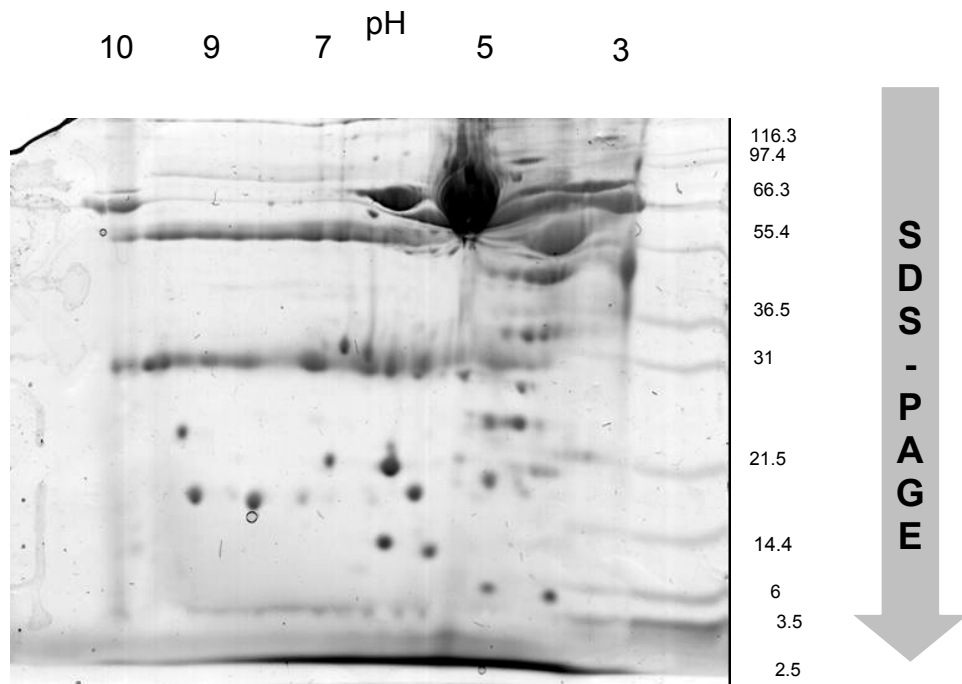


Figura 8. Gel representativo del grupo de pacientes con Nefropatía diabética

En la figura 9 se presenta un gel representativo del grupo de pacientes con rechazo al injerto renal.

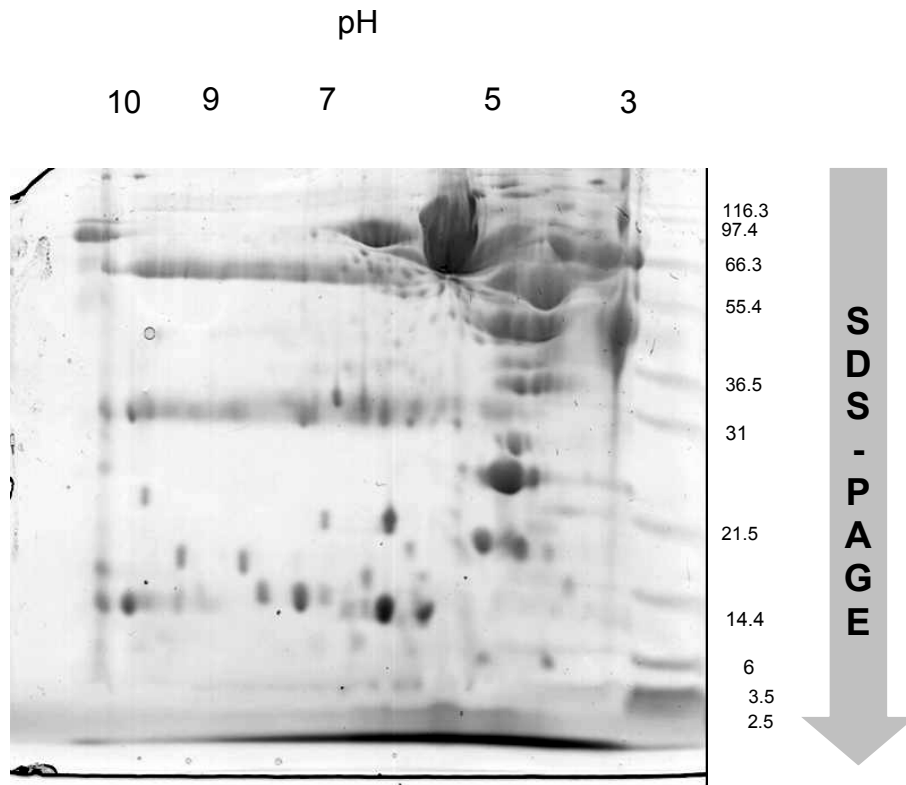


Figura 9. Gel representativo del grupo de pacientes con rechazo al injerto renal.

En el gel correspondiente al grupo de pacientes con rechazo al injerto renal también se observaron mejor definidas las manchas de PM inferior a 25 kDa, además de apreciarse a simple vista una mayor diversidad de proteínas comparado con el gel representativo del grupo de pacientes con ND.

En el grupo de pacientes con trasplante renal de evolución estable, un paciente presentó un patrón electroforético diferente al de los otros cuatro pacientes, por lo que se decidió no considerar a ese paciente para los cálculos en el número de manchas, ya que modificaría los resultados del grupo. El gel de dicho paciente se muestra en la figura 10.

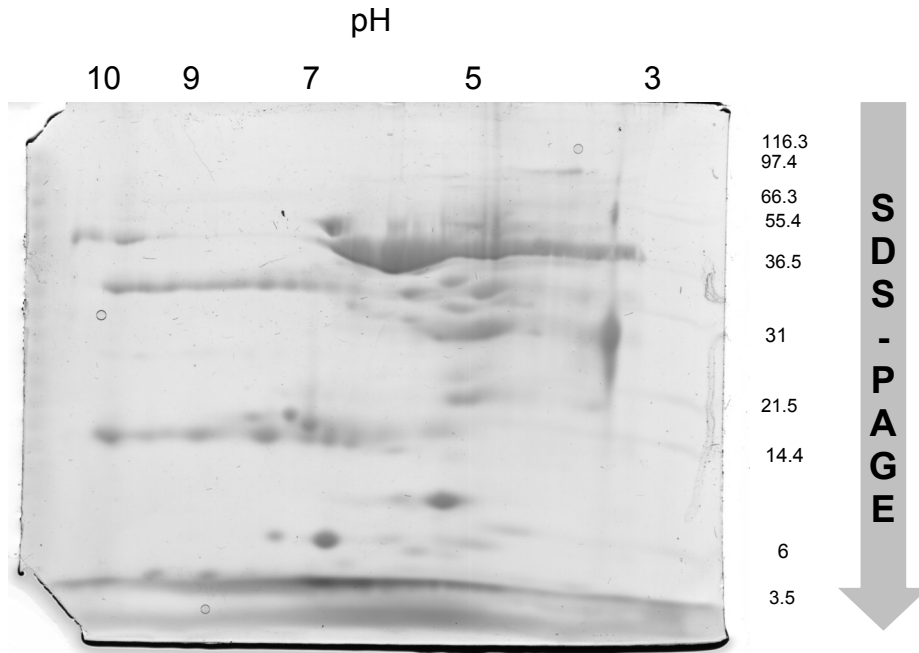


Figura 10. Gel de paciente del grupo de evolución estable no característico del grupo.

En la figura 11 se muestra un gel representativo del resto del grupo de pacientes con evolución estable.

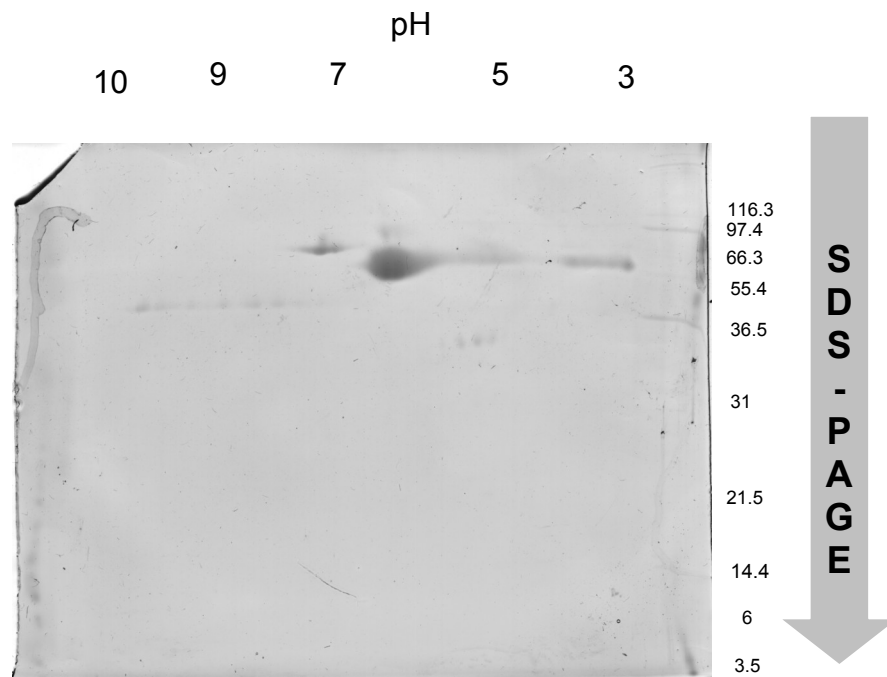


Figura 11. Gel representativo del grupo de pacientes con evolución estable, característico en cuatro de los cinco pacientes.

Los geles del resto del grupo de pacientes trasplantados con evolución estable presentó un patrón electroforético como el que se muestra en la figura 11. En tres de los cuatro pacientes se pudo detectar la presencia de una mancha muy intensa a un pI de 6.3 y PM de 66.5 aproximadamente, que no puede considerarse como característica del grupo ya que también se presentó en los geles de los pacientes de los otros grupos de estudio.

### 3.3 Validación del método de electroforesis bidimensional de proteínas en orina.

Los valores obtenidos del calibrador añadido a 15 muestras se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Valores prácticos del calibrador en las muestras (tripsinógeno PM = 24 kDa; pl = 9.3)

Mta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PM	24	23	23	23	24	22	22	24	25	24	23	24	22	25	24
pl	9	9.2	8.9	9.4	9.4	9.3	9.3	9.1	9.4	9	9.3	9.3	8.9	9.4	9.2

Estos datos se utilizaron para realizar la validación del método calculando precisión y exactitud del método electroforético para muestras de orina.

#### 3.3.1 Precisión del método.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores calculados para determinar precisión del método.

	pl	PM
Valor teórico	9.3	24
Promedio (n=15)	9.2	23.5
Desviación estándar	0.2	1
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	<b>2</b>	<b>4.2</b>

Tanto en pl como en PM el coeficiente de variación fue inferior a 5% por lo tanto se consideró que el método tuvo una precisión aceptable.

### 3.3.2 Exactitud del método.

Los resultados de la aplicación de la prueba t de Student para el cálculo de la exactitud de método en la determinación del pl se muestran la tabla 7.

Tabla 7. Prueba t para valores de pl obtenidos  
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>pl teórico</i>	<i>pl obtenido</i>
Media	9.3	9.20666667
Varianza	1.6241E-14	0.03352381
Observaciones	15	15
Grados de libertad	14	
Estadístico t	1.974266262	
P(T<=t) una cola	0.034208582	
Valor crítico de t (una cola)	1.76130925	
P(T<=t) dos colas	0.068417163	
Valor crítico de t (dos colas)	2.144788596	

El valor crítico de t (2.14) fue superior al valor del estadístico t (1.97) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza  $p = 0.05$  para el cálculo del pl.

Los resultados de la aplicación de la prueba T de Student para el cálculo de la exactitud de método en la determinación del PM se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Prueba T para valores de PM obtenidos  
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>PM teórico</i>	<i>PM obtenido</i>
Media	24	23.4666667
Varianza	0	0.98095238
Observaciones	15	15
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.08554898	
P(T<=t) una cola	0.02790192	
Valor crítico de t (una cola)	1.76130925	
P(T<=t) dos colas	0.05580383	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1447886	

El valor crítico de t (2.14) fue superior al valor del estadístico t (2.08) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza  $p = 0.05$  para el cálculo del PM.

### 3.4 Identificación de los diferentes perfiles de expresión proteica entre los grupos de estudio.

#### 3.4.1 Detección y edición de manchas, introducción de datos complementarios y reporte de manchas.

Para cumplir con este objetivo primero se realizó la detección de las manchas de cada gel con el programa Image Master 2D Platinum, Amersham.

En la figura 12 se presenta una imagen que muestra los pasos realizados para la detección de las manchas en los geles a evaluar.

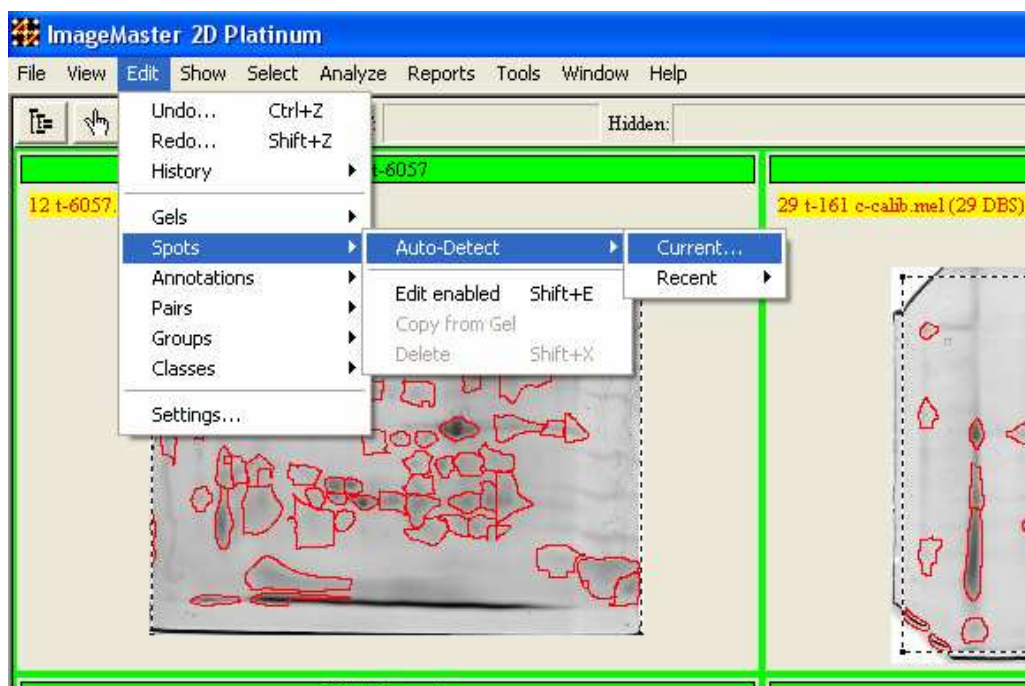


Figura 12. Representación del análisis para la detección de manchas



El objetivo de la introducción de los datos fue para que al momento de solicitar al programa la emisión del reporte de las manchas, estuviera incluida la información de pl y PM.

En la figura 13 se muestra un ejemplo de los reportes emitidos por el equipo en el que se incluyó la información de las manchas del paciente seleccionado.

Information on selected Spots.

	GelName	Id	SpotID	X	Y	pI	MW	Intensity
1	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	200	953	6	2.92308	392	0.0631262
2	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	204	848	8	3.92038	385	0.0669351
3	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	216	954	18	2.91346	348	0.106587
4	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	217	852	21	3.88599	338	0.0324969
5	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	218	836	22	4.02357	335	0.0205733
6	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	223	723	44	4.99522	269	0.0308734
7	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	224	733	43	4.90924	272	0.0166147
8	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	225	952	46	2.93269	264	0.0734129
9	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	227	709	49	5.11561	256	0.0513359
10	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	228	767	45	4.61688	267	0.0421586
11	MLCT t-409	d7e1f237-d09c-42a3-a282-932d120f7	229	785	46	4.46210	264	0.0365237

Figura 13. Ejemplo de un reporte de manchas.

### 3.4.2 Empalme de imágenes e identificación de manchas características

En la figura 14 se presenta un ejemplo de reporte de pares.

Information on selected Pairs (Reference gel: 78 t-6056.mel).

	t-408 c	78 t-6056	76 t-399	77 t-6064 c-calib	MLM t-410	76 t-
40	186	611	-	-	-	-
41	-	603	687	-	-	-
42	181	602	702	-	-	-
43	-	601	694	-	-	-
44	-	599	-	-	-	-
45	-	598	701	-	-	-
46	-	597	684	419	-	-
47	187	596	-	-	-	-
48	188	595	-	-	-	-
49	-	592	688	-	-	-
50	189	591	683	421	-	-
51	-	576	645	-	-	-
52	-	573	-	-	-	-
53	-	570	-	-	-	-

Figura 14. Representación de la emisión del reporte de manchas de acuerdo a su identificación.

Teniendo la información de las manchas que coinciden en cada grupo se seleccionaron en los geles y se solicitó al programa la información de dichas manchas. En la figura 15 se muestra un ejemplo de los reportes de la información de las manchas que coinciden dentro de un grupo

Information on selected Spots:

	GelName	Id	SpotID	X	Y	pI	MW	Intensity	Area	Vol	%Intensity
1	78 t-6056	c6664dcf	597	531	337	6.22286	31	0.254528	6.54484	0.547678	0.816617
3	76 t-399	0bc0607a	683	579	344	6.19197	32	0.103203	18.7815	0.679262	1.35823
4	MLM t-408 c-cal	536b94ac	172	542	374	6.05502	33	0.108323	9.00364	0.525945	1.16118

Figura 15. Reporte de información de manchas características de uno de los grupos de trabajo.

De esta manera se pudo conocer qué manchas estaban presentes en cada grupo. Después se hizo la comparación entre el grupo de pacientes con nefropatía diabética y el grupo de pacientes con rechazo al injerto. Las manchas presentes en ambos grupos se descartaron para considerar al resto como las manchas características de cada grupo de estudio.

En la tabla 9 se presenta la información de las manchas que resultaron características del grupo de pacientes con rechazo al injerto renal.

Tabla 9. Manchas características del grupo de pacientes con rechazo agudo al injerto renal

<b>Grupo de pacientes con rechazo</b>		
<b>No. Pacientes</b>	<b>pI aprox.</b>	<b>PM aprox. (kDa)</b>
<b>5</b>	<b>5.5</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>6.8</b>	<b>14.4</b>
<b>4</b>	<b>5.2</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>8.5</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>4.6</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>5.3</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>5.5</b>	<b>22.5</b>

En la tabla 10 se presenta la información de las manchas características del grupo de pacientes con nefropatía diabética.

Tabla 10. Manchas características del grupo de pacientes con nefropatía diabética.

**Grupo pacientes con nefropatía diabética**

<b>No. Pacientes</b>	<b>pI aprox.</b>	<b>PM aprox. (kDa)</b>
<b>4</b>	<b>4.8</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>5.9</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>6.4</b>	<b>31.5</b>
<b>3</b>	<b>7.4</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>4.9</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>4.5</b>	<b>28</b>

En el caso del grupo de pacientes trasplantados con evolución estable; y sin considerar al paciente con alta diversidad de proteínas, en tres de los cuatro se encontró una proteína de 66.5 kDa y pI de 6.3, sin embargo, no se puede decir que sea una proteína característica ya que también se presentó en la mayoría de los pacientes de los otros grupos de estudio.

**CAPÍTULO 4****DISCUSIÓN**

Actualmente los resultados de la creatinina sérica y la diuresis, se utilizan para el diagnóstico de las enfermedades renales, así como para evaluar la función renal o el rechazo al injerto que presenta un paciente nefrópata o que ha sido sometido a un trasplante renal (Lamiere *et al.*, 2005; Hewitt *et al.*, 2004; Oetting *et al.*, 2006; Essawy *et al.*, 2006). Comparando los resultados de los parámetros bioquímicos entre los diferentes grupos de pacientes, se observó un aumento en la creatinina sérica ( $5.7 \pm 4.4$  mg/dL vs.  $1.1 \pm 0.1$  mg/dL) y disminución en la diuresis ( $1580 \pm 572$  vs.  $3500 \pm 1216$  mL/24h) en el grupo de pacientes trasplantados con rechazo al injerto renal con respecto al grupo de pacientes trasplantados con evolución estable. Dentro del grupo de pacientes a los que se les dio seguimiento, tres mas presentaron alteraciones bioquímicas, se sospechó de rechazo y se les tomó biopsia, sin embargo el resultado fue negativo para rechazo, lo que justifica la búsqueda de biomarcadores más específicos y sensibles para el diagnóstico de rechazo al injerto renal tal como lo reportan algunos autores (Vidal *et al.*, 2005; Riordan, *et al.*, 2004).

Tres de los cinco pacientes presentaron rechazo a los 8 días post-trasplante, uno presentó rechazo 10 días post-trasplante y otro a los 11 días post-trasplante, por lo que las muestras de orina de los pacientes de evolución estable se eligieron al azar y se trabajó con las muestras que se colectaron a los 7 días post-trasplante para que fueran lo más cercanas en tiempo post-trasplante a las del grupo de pacientes con rechazo al injerto.

Se han descrito diversos métodos para el pretratamiento de muestras de orina y en algunas publicaciones sugieren la combinación de técnicas de separación y concentración como la diálisis, la ultrafiltración y la precipitación con solventes (Thongboonkerd *et al.*, 2002; Vojtová *et al.*, 2007). En este trabajo se probaron diferentes alternativas para el pretratamiento: la precipitación con acetona, en la cual pudiera no haberse eliminado totalmente los electrolitos presentes en la muestra ya que las proteínas no se separaron adecuadamente y se observó una mancha grande que podría estar impidiendo la visibilidad de manchas más pequeñas; limpieza y precipitación con acetona, con este pretratamiento se obtuvieron geles con baja o nula resolución de manchas, y, al igual que al precipitar con acetona se siguió presentando una mancha grande; la eliminación de la albúmina y la precipitación con acetona se encontró una baja concentración de proteínas después de eliminar la albúmina, con esto se confirmó la presencia de esta proteína en altas concentraciones en las muestras, de ahí, la importancia de su eliminación.

Los mejores resultados se obtuvieron al combinar la ultrafiltración y la precipitación con acetona ya que se pudo obtener mejor resolución de las manchas y con 150  $\mu\text{g}$  de proteína añadida a la tira se pudo apreciar mejor la diversidad de las manchas.

Khan y Packer en 2006 utilizaron otras alternativas de pretratamiento de muestras de orina. En ese trabajo el sujeto de estudio fue una persona sana. En el caso del presente trabajo se trató de pacientes con daño renal, en los que es común la alta excreción de albúmina a través de la orina, suceso que en personas sanas no es común. Debido a esto, el método de eliminación de albúmina en las muestras antes de someterse a la electroforesis bidimensional fue de vital importancia para poder visualizar las proteínas que se encontraban en menor proporción con respecto a la albúmina.

Para realizar la validación del método electroforético, se calculó el CV de un estándar de pI y PM conocido que se agregó a 15 muestras. Se calculó el CV de los valores obtenidos de las manchas correspondientes al estándar para determinar la precisión, se obtuvo en el caso del pI un CV de 2% y para el PM un CV de 4.2%; debido a que ambos valores de CV son inferiores al 5%, se estableció que el método es preciso para la determinación de pI y PM con un nivel de confianza del 95%.

En el caso de la evaluación de la exactitud del método electroforético se aplicó la prueba t de Student a los valores obtenidos. El valor crítico de t (2.14) fue superior al valor del estadístico t (1.97) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza  $p = 0.05$  para el cálculo del pI, mientras que en la aplicación de la prueba t de Student para los valores de PM se obtuvo que el valor crítico de t (2.14) también fue superior al valor del estadístico t (2.08) lo que significó que el método tuvo la exactitud requerida para un nivel de confianza  $p = 0.05$  para el cálculo del PM.

Se han publicado análisis proteómicos de muestras de orina por SELDI-TOF para grupos de pacientes con trasplante renal que presentaron rechazo agudo, en los que han encontrado proteínas como posibles biomarcadores reportando su PM; entre ellas se encontró una de 25.7 kDa y otra de 28.1 kDa (Reichelt, *et al.*, 2006). En nuestro trabajo se encontró una proteína de 29 kDa en el grupo de pacientes con rechazo al injerto renal; de modo que es posible que se trate de la misma proteína.

En otro estudio también realizado utilizando SELDI-TOF se reportó la presencia de 5 proteínas en muestras de orina de un grupo de rechazo agudo al injerto renal, de 6.5, 6.6, 6.7, 7.1 y 13.4 kDa (Clarke *et al.*, 2003). Dentro de las proteínas que se detectaron en el presente trabajo, se encontró en los cinco pacientes del grupo de rechazo una de pI 6.8 y PM 14.4 kDa, peso molecular similar al de una de las proteínas encontradas por Clarke y cols.



En 2004 se publicó otro estudio donde por medio de SELDI-TOF, 7 proteínas en la orina de un grupo de pacientes con rechazo al injerto renal de las cuales una era de 19 kDa, similar al peso molecular (18 kDa) de una de las proteínas detectadas en el presente trabajo en cuatro de los cinco pacientes del grupo que presentó rechazo al injerto renal.

Algunos estudios refieren la presencia en muestras de orina de  $\alpha$ -1-microglobulina de pl 5.3 y PM 33 como característica de pacientes con daño tubular (Weber *et al.*, 1992; Tomlinson *et al.*, 1997). En 2002 el grupo de trabajo del Departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias de la India (Kumar *et al.*, 2002) reportó la presencia de  $\alpha$ -1-microglobulina con pl 5.3 y 33 kDa y  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida con pl 3.5 y 43 kDa en un grupo de pacientes con microalbuminuria, considerándola como un candidato biomarcador para pacientes con ND; sin embargo en 2005 éste mismo grupo de trabajo (Jain *et al.*, 2005) reportó a éstas mismas proteínas con diferentes características de pl y PM a los cuales les asignaron el mismo nombre que las del reporte anterior en pacientes con el mismo padecimiento. En el presente trabajo se encontró una mancha de pl 5.5 y 34 kDa que, si se tomara como referencia lo reportado por Kumar y cols. correspondería a  $\alpha$ -1-microglobulina, sin embargo este resultado fue del grupo de pacientes que presentaron rechazo al injerto renal. Dada la incongruencia en los resultados reportados en 2002 y 2005 por el grupo de trabajo de la India, no es de extrañar ésta diferencia encontrada.

Con respecto al paciente trasplantado catalogado como de evolución estable de acuerdo a los parámetros bioquímicos, y que sin embargo presentó un patrón electroforético atípico con respecto al resto del grupo, se revisó con el grupo de médicos la etiología de origen, se estableció que tenía ND, por lo que se sigue de cerca su evolución post-trasplante para detectar si la diferencia en el perfil electroforético es un hallazgo de la reincidencia de la patología inicial o de un posible rechazo que no haya reflejado cambios en los parámetros bioquímicos.

En 2007 Rao y cols. realizaron el análisis proteómico de muestras de orina de pacientes con DM tipo 2 con macroalbuminuria, donde encontraron 11 proteínas expresadas diferencialmente por comparación de éste grupo con un grupo de pacientes con DM tipo 2 sin albuminuria. Las proteínas que encontraron fueron  $\alpha$ -1B-glicoproteína, zinc  $\alpha$ -1-glicoproteína, proteína ligadora de vitamina D (VDBP),  $\alpha$ 2-HS- glicoproteína, calgranulina B,  $\alpha$ -1-antitripsina, hemopexina, proteína ligadora de retinol en plasma (plasma RBP), precursor de la proteína  $\alpha$ -1-microglobulina/bikunina (AMBP), apolipoproteína A-1 y transtiretina. La calgranulina B tiene pI 6 y 13.2 kDa. En el presente trabajo en el grupo de pacientes con ND se detectó en cuatro pacientes una mancha de pI 5.9 y 14 kDa, es posible que se trate de la misma proteína.

Los resultados encontrados en el presente trabajo podrían llegar a ser parte de las herramientas de diagnóstico de las enfermedades renales y en el diagnóstico de rechazo al injerto; sin embargo se requiere aumentar la cantidad de pacientes para definir si estas proteínas son específicas de cada grupo de estudio para poder considerarlos como biomarcadores.

**CAPÍTULO 5****CONCLUSIONES**

- ✓ Se logró obtener un método exacto y preciso para análisis de proteínas en orina por electroforesis bidimensional
  
- ✓ Éste método permitió establecer un perfil de expresión diferente en cada grupo de estudio, se encontraron 7 proteínas características del grupo de pacientes que presentaron rechazo al injerto renal, 6 proteínas en el grupo de pacientes con nefropatía diabética.
  
- ✓ El pretratamiento fue un punto crítico en el procesamiento de muestras de orina para su análisis por electroforesis bidimensional ya que, ya que en esta matriz además de las proteínas, se encuentran presentes de manera natural sólidos y electrolitos que causan interferencias en procesos de separación como el isoelectroenfoque, lo cual puede conllevar a una baja resolución de las manchas.

**CAPÍTULO 6****PERSPECTIVAS**

- Aumentar el tamaño de la muestra de pacientes para que los resultados obtenidos tengan mayor relevancia estadística y puedan considerarse representativos.
  
- Incluir más grupos de pacientes con otras nefropatías.
  
- Realizar la identificación de las proteínas encontradas en cada grupo de pacientes mediante la metodología de MALDI-TOF y otras metodologías complementarias, esto para poder utilizarlas como biomarcadores.

**CAPÍTULO 7****ANEXOS****7.1 Carta de consentimiento informado.**

**Título del proyecto: “Análisis Proteómico de proteínas asociadas con rechazo al aloinjerto renal y nefropatías”.**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Los métodos disponibles para establecer el diagnóstico de algunas enfermedades renales y la detección del rechazo agudo en un órgano trasplantado (respuesta negativa del organismo hacia el órgano recibido) incluyen exámenes de laboratorio y biopsias de tejido. La biopsia es considerada como el mejor método para el diagnóstico de rechazo y retraso de la función del órgano e indispensable en el diagnóstico de algunas enfermedades renales. Sin embargo, la toma de biopsia renal es costosa y está asociada a condiciones incapacitantes y complicaciones en las cuales se incluyen dolor, sangrado al orina, moretones, daño en órganos cercanos, problemas para orina, formación de coágulos en el órgano trasplantado, infecciones, falla general del organismo y ocasionalmente muerte del paciente. Además, las biopsias también se presentan errores de muestreo y diferencias entre lo encontrado en los exámenes clínicos y lo observado en la biopsia. La búsqueda y empleo de sustancias específicas presentes en sangre y orina pueden beneficiar al paciente que ha sido trasplantado de riñón permitiendo el monitoreo más frecuente y modificar la terapia inmunosupresora oportunamente y al paciente en el que se está estableciendo un diagnóstico de enfermedad renal iniciando una terapia adecuada antes de que la enfermedad se

complicue. Por ello se le hace una atenta invitación, para que done una muestra de sangre y nos proporcione una muestra de orina. Su colaboración contribuirá a que se realice la identificación de dichas sustancias específicas y tener mayor información para el seguimiento y detección de complicaciones utilizando pruebas menos agresivas.

#### **Procedimiento del estudio**

- **Pacientes diagnóstico de nefropatía diabética:** Se les tomará una muestra de sangre del brazo (10 mL de sangre en total) y se le solicitará una muestra de orina (aproximadamente 40 mL) una sola ocasión antes de la biopsia.
- **Pacientes programados para trasplante:** Se les tomará una muestra de sangre del brazo (20 mL de sangre) y se le solicitará una muestra de orina (aproximadamente 40 mL) antes del trasplante. Posterior al trasplante se volverán a realizar tomas a las 3, 6, 9, 12, horas, 1, 2, 3 días (20 mL de sangre en cada toma) 7, 15 y 30 días (20 mL de sangre y aproximadamente 40 mL de orina en cada toma). 220 mL de sangre en total y 160 mL de orina aproximadamente.
- **Pacientes trasplantados en los que se sospeche rechazo y tengan indicación de biopsia:** Se les realizará una toma de sangre del brazo y se le solicitará una muestra de orina en cuatro ocasiones: antes de la biopsia, (20 mL de sangre y 40 mL de orina aproximadamente).

Estas muestras se utilizarán para realizar la detección e identificación de proteínas que pueden funcionar como indicadores.

#### **Riesgos asociados al estudio**

Los riesgos asociados a esta prueba no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser algún moretón en el sitio donde se realiza la punción para la toma de la muestra.

#### **Beneficios que aportará el estudio al paciente**

Mediatos: Minimizar la necesidad de la biopsia para determinar el estado del paciente, sustituyéndola por métodos no invasivos como la detección de sustancias indicadoras.

Estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además estoy en la libertad de retirarme en el momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario. La información obtenida de la investigación será manejada de forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además el Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos de este proyecto de investigación, en caso de dañarme permanentemente tendré derecho a ser indemnizado según el daño sufrido.

Responsables de la investigación:

- a) Investigador Principal
  - a. Dr. Miguel Mariano Escobedo
- b) Investigadores Asociados

- a. Dra. Paula Cordero Pérez
- b. Dra. Concepción Sánchez

**Paciente**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_

**Testigo**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

**Investigador**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_



## 7.2 Preparación de reactivos.

### 7.2.1 Azul de bromofenol 1%

Azul de bromofenol	0.5 g
--------------------	-------

Se completó a un volumen de 50 mL con agua bidestilada y se mantuvo a temperatura ambiente.

### 7.2.2 Buffer de rehidratación

Urea	12 g
------	------

CHAPS	0.5 g
-------	-------

Buffer IPG rango pH 3 – 10	125 $\mu$ L
----------------------------	-------------

Azul de bromofenol 1%	50 $\mu$ L
-----------------------	------------

Se completó a un volumen de 25 mL con agua bidestilada, se hicieron alícuotas de 1.5 mL y se mantuvieron en congelación a -20° C.

Inmediatamente antes de usar se agregaron 4.2  $\mu$ g de DTT.

### 7.2.3 Buffer de resolución 4x:

Tris Base (PM 121.1)	181.7 g
----------------------	---------

Agua bidestilada	750 mL
------------------	--------

Se ajustó a un pH 8.8 con HCl y se completó a un volumen de 1 L con agua bidestilada, se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ m, se mantuvo en refrigeración de 0 – 4° C hasta su uso.

#### 7.2.4 Buffer de Equilibrio:

Buffer de resolución 4x	10 mL
Urea	72.07 g
Glicerol 87%	69 mL
SDS	4 g
Azul de bromofenol 1%	0.4 mL

Se completó a un volumen de 200 mL con agua bidestilada, se hicieron alícuotas de 5 mL y se mantuvieron en congelación. Inmediatamente antes de usarse, a una alícuota se agregaron 300  $\mu$ L de DTT 1M y a otra alícuota se agregaron 125 mg de IAA.

#### 7.2.5 Docecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%

SDS	5 g
-----	-----

Se completó a un volumen de 50 mL con agua bidestilada, se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ m, se mantuvo a temperatura ambiente.

#### 7.2.6 Solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30/0.8%):

Acrilamida grado biología molecular	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

Se completó a un volumen final de 100 mL con agua bidestilada, se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ m, se protegió de la luz y se mantuvo en refrigeración de 0 – 4° C hasta su uso.

### 7.2.7 Persulfato de amonio (PSA) 10%

PSA	0.05 g
-----	--------

Se disolvieron en 0.5 mL con agua bidestilada inmediatamente antes de la preparación de los geles de poliacrilamida.

### 7.2.8 SDS-PAGE 12%

Solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30/0.8%):	6.25 mL
---	---------

Buffer de Resolución 4x:	3.75 mL
--------------------------	---------

SDS10%:	0.15 mL
---------	---------

Agua milliQ:	4.67 mL
--------------	---------

PSA 10%:	0.15 mL
----------	---------

TEMED:	0.03 mL
--------	---------

La preparación de los geles se realizó utilizando vidrios de 1mm perfectamente limpios y secos.

### 7.2.9 Buffer de electroforesis 10x

Tris base (PM 121.1)	30.3 g
----------------------	--------

Glicerina	144 g
-----------	-------

SDS	10 g
-----	------

Se completó con agua bidestilada a 1 L. Se mantuvo a temperatura ambiente. Se diluyó 1:10 para su uso.

#### 7.2.10 Solución de sellado de agarosa

Agarosa	0.5g
Azul de bromofenol 1%	200 $\mu$ L

Se completó a un volumen de 100 mL con agua bidestilada, se calentó en microondas y se separó en alícuotas de 1 mL.

#### 7.2.11 Solución de tinción de azul de coomassie

Azul de Coomassie	50 mg
Ácido Acético glacial	7 mL
Metanol	50 mL

Se completó a 100 mL con agua bidestilada.

#### 7.2.12 Solución de destinción

Ácido Acético glacial	50 mL
Metanol	1.65 mL

Se completó a 1 L con agua bidestilada y se mantuvo a temperatura ambiente.

**BIBLIOGRAFÍA****8.1 Artículos.**

- Archivos Coordinación de Trasplante del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Datos no publicados).
- Asirvatham V, Watson B, Summer L. Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago truncatula* by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2002; 2: 960 – 968.
- Clarke W. Proteomic research in renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2006, 28 (1): 19 – 21.
- Colvin R, Cohen A, Saiontz C, Bonsib S, Buick B, Carter S, Cavallo T, Haas M, Lindblad, Manivel C, Nast C, Salomon D, Weaver C, Weiss M. Evaluation of Pathologic criteria for Acute Renal allograft rejection: reproducibility, sensibility and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1930 – 1941.

- De Francisco A, Fernández G, Piñera C, Rodrigo E, Herrera I, Ruiz J, Arias M. Tratamiento renal sustitutivo en el paciente diabético ¿Quién, cuándo, cómo?. *Nefrología* 2001; 3: 88 - 96.
- Dib A, Aburto S, Espinosa A, Sánchez O. Trasplante de órganos y tejidos en México. *Rev Invest C* 2005; 57 (2): 163 -169.
- Essaway B, Otu H, COI B, Zheng X, Libermann T, Strom T. Proteomic analysis of the allograft response. *Transplantation* 2006; 82: 267 – 274.
- García H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 2000; 1 (2):31 – 41.
- Gil C. La metodología proteómica una herramienta para la búsqueda de función. *Actualidad SEM* 2003; 35:12 – 20.
- Gross J, Azevedo M, Silveiro S, Canani L, Caramori M, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: Diagnosis prevention and treatment. *Diabetes Care* 2005; 28: 176 – 188.
- Hewitt S, Dear J, Star R. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1677 – 1689.
- Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluri, Arvind A, Tatu U. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorders. *JAPI* 2005; 53: 513 – 520.
- Khan A, Packer N. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res* 2006, 5: 2824 – 2838.
- Knepper M. Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1398 – 1408.

- Kumar Y, Rao N, Uppuluri V, Babu K, Phadke, Kumar P, Ballal S, Tatu U. Proteomics of renal disorders: urinary proteome analysis by two dimensional gel electrophoresis and MALDI –TOF mass spectrometry. *Current Sci India* 2002; 82 (6): 655 – 663.
- Kurian S, Flechner, Salomon D. Genomics and proteomics in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10:191 – 197.
- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005; 365:417 – 430.
- Levey A, Coresh J, Balk E, Kausz A, Levin A, Steffes M, Hogg R, Perrone R, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation Practice Guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification and stratification. *Ann Int Med* 2003; 139: 137 – 147.
- Li B, Hartono Ch, Ding R, Sarna V, Ramaswamy R, Qian B, Segur D, Mouradian J, Schwartz J, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *NEJM* 2001; 344 (13): 947 – 954.
- Macía M, Macía M, Coronel F. Nefropatía diabética: fisiopatología y curso clínico. *Nefrología* 2001; 21(3): 24 – 31.
- Martínez A. Repercusiones clínicas y sociales de la epidemia de Diabetes Mellitus. *Nefrología* 2008; 23 (3): 245 – 248.
- Mendoza E, Huerta B. Trasplante Renal. *Archivos de Cardiología de México* 2002; 71 (1): 267 – 270.

- Oetting W, Rogers T, Krick T, Matas A, Ibrahim H. Urinary  $\beta_2$  Microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2006; 47 (5):898 – 904.
- O'Farrel P. High Resolution Two Dimensional Electrophoresis. *The J Biol Chem* 1974; 250: 4007-4021.
- Olaiz G, Rojas R, Aguilar C, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos Mexicanos: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública de México* 2007; 49 (3): 331 – 337.
- Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.
- O'riordan E, Orlova T, Mei J, Butt K, Chander P, Rahman S, Mya M, Hu R, Momin J, Eng E, Hampel D, Hartman B, Kretzler M, Delaney V. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 12: 3240 – 3248.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib M, Castro C, Cavallo T, Croker B, Demetris J, Drachember C, Fogo A, Furness P, Gaber L, Ginson I, Glotz D, Goldberg J, Grande J, Halloran P, Hansen H, Hartley B, Hayry P, Hill C, Hoffman E, Hunsicker L, Lindblad A, Marcussen N, Mihatsch M, Nadasdy T, Nickerson P, Olsen T, Papadimitriou J, Randhawa P, Rayner D, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas L, Salomon D, Sund S, Taskinen E,



Trpkov K, Yamaguchi Y. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55:713-723.

- Rao P, Lu X, Standley M, Pattee P, Girish G, Dakshinamurthy K, Charles T, Roberts J, Nagalla S. Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2007; 30:629 – 637.
- Reichelt O, Müller J, Von Eggeling F, Driesch D, Wunderlich H, Schubert J, Grone HJ, Stein G, Ott U, Junker K. Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using proteinchip arrays (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time of Flight-Mass Spectrometry). *Urology* 2006; 67: 472 – 475.
- Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson I, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J, Nickerson P. Proteomic-Based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 219 – 227.
- Schaub S, Wilkins J, Antonovici M, Krokhin O, Wailer T, Rush D, Nickerson P. Proteomics-Based Identification of cleaved urinary b2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* 2006; 5: 729 – 738.
- Souillou JP. Immune monitoring for rejection of kidney transplants. *NEJM*; 344, 13: 1006 – 1007.
- Thongboonkerd, V, McLeish K, Arthur J, Klein J. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 2002; 62, 1461-1469.

- Tomlinson P, Dalton R, Hartley B, Haycock G, Chantler C. Low molecular weight protein excretion in glomerular disease: a comparative analysis. *Pediatric Nephrol* 1997; 11 (3): 285 – 290.
- Vidal B, Bonventre J, I Hong Hsu S. Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis. *Clin Sci* 2005; 109: 421 – 430.
- Vivanco F, López L, Tuñón J, Egido J. Proteómica y enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56 (3): 289 – 302.
- Vojtová L, Zima T, Tesar V, Kazderová M. Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. *Folia Biologica* 2007; 53: 58 – 65.
- Weber M, Verwiebe R.  $\alpha$  1-Microglobulin (protein HC): features of a promising indicator of proximal tubular dysfunction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 683 – 691.
- Wild S, Rolic G, Green A, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047 – 1053.
- Xu B, Yoshida Y, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T, Yamamoto T. Two dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney: differential protein expression in glomerulus, cortex and medulla. *J Electrophoresis* 2005; 49: 5 – 13.

## **8.2 Libros, insertos y manuales.**

- Berkelman T, Stenstedt T; 2-D Electrophoresis: using immobilized pH gradients, Principles and Methods; Amersham Biosciences 1998

- Inserto 2D Quant, Amersham.
- Inserto 2D Clean Up Kit, Amersham.
- Inserto Centricon® Centrifugal Filter Devices, Millipore.
- Inserto Montage™ Albumin Deplete Kit, Millipore.
- Lorenzo Sellarés V, Torres Ramírez A, Hernández Marrero D, Ayus JC. Manual de Nefrología, 2ª edición; Ediciones Harcourt, Elsevier Science, España 2002.
- Manual del usuario, ImageMaster™ versión 5.0, Amersham Biosciences.
- Manual del usuario, LabScan™ versión 5.0, Amersham Biosciences.
- Manual del operador, Vitros DT II Chemistry System, Ortho – Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson Company.
- Ulate Montero G; Fisiología Renal; Editorial UCR; 2006.
- Vives J, Aguilar J; Manual de técnicas de laboratorio en hematología; 3ª. Edición, Editorial Masson, Elsevier Science, España 2006.

#### **Páginas de internet.**

- Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) [www.cenatra.gob.mx](http://www.cenatra.gob.mx)
- Universidad de Barcelona  
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm#SDS-PAG>