

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología



**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE
MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO
GINGIVAL. AREQUIPA, 2023.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Tejada Alferez, Viviana Fernanda

para optar el Título Profesional de:

Cirujana Dentista

Asesor (a):

**Dr. Obando Pereda, Gustavo
Alberto**

Arequipa- Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Octubre del 2023

Dictamen: 010090-C-EPO-2023

Visto el borrador del expediente 010090, presentado por:

2017202962 - TEJADA ALFEREZ VIVIANA FERNANDA

Titulado:

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES
MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. AREQUIPA, 2023.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29286016 - ALVARADO ACO ALBERTO ARMANDO
DICTAMINADOR**



**29221048 - MOYA DE CALDERON ZAIDA ARILMY
DICTAMINADOR**



**29547819 - ALVAREZ MONGE RUTH
DICTAMINADOR**



ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. AREQUIPA, 2023.

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

11%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
2	www.medigraphic.com Fuente de Internet	1%
3	db.systemsbiology.net Fuente de Internet	1%
4	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	www.jove.com Fuente de Internet	1%
6	theses.ncl.ac.uk Fuente de Internet	1%
7	1library.co Fuente de Internet	1%
8	research.library.mun.ca Fuente de Internet	1%

9

repositorio.unsa.edu.pe

Fuente de Internet

1 %

10

www.frontiersin.org

Fuente de Internet

1 %

11

www.antibodies-online.com

Fuente de Internet

1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

DEDICATORIA:

*Doy gracias a **Dios**, por haberme dado fuerza para culminar esta etapa de mi vida.*

*A **mis padres y hermano** por apoyarme y guiarme siempre, por sus consejos y por darme ánimos en los momentos más difíciles.*

*A **mis abuelitos**, quienes ya no están conmigo, por su cariño incondicional.*

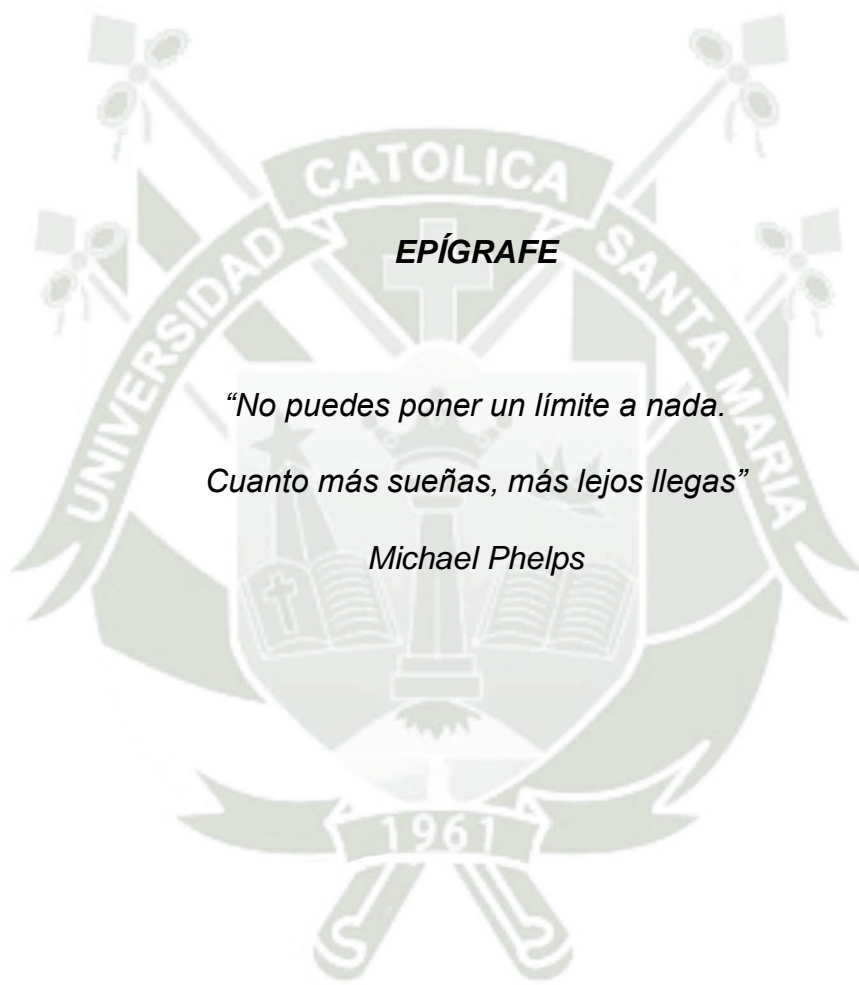
*A **Emilio**, por su apoyo y por acompañarme siempre.*



AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al **Doctor Luis Ponce y Gustavo Obando**, mis asesores,
por su paciencia y por guiarme durante todo este tiempo.

A las doctoras **Ruth Alvarez, Zaida Moya** y doctor **Alberto Alvarado**
por su tiempo, paciencia y por transmitirme sus conocimientos.



EPÍGRAFE

*“No puedes poner un límite a nada.
Cuanto más sueñas, más lejos llegas”*

Michael Phelps

RESUMEN

La gingivitis es la segunda enfermedad más común de la cavidad oral, es un proceso inflamatorio agudo que produce sangrado al sondaje, se observa irritación, inflamación y enrojecimiento de las encías, específicamente de la encía libre e interproximal. Su diagnóstico suele realizarlo el odontólogo, de forma clínica.

El objetivo de este estudio experimental fue comparar 5 muestras de pacientes con gingivitis y 5 muestras de pacientes sanos, obtenidas del Líquido Gingival Crevicular (GCF), para encontrar biomarcadores en la detección de gingivitis, usando Electroforesis Bidimensional (2D-PAGE), Espectrometría de Masas (MS/MS) y Bases de datos de bioinformática. (MASCOT, PATTERNLAB)

Como resultado, se obtuvieron 4 biomarcadores para la detección de gingivitis: “Región Variable de Inmunoglobulina”, “Haptoglobina”, “Protocadherina beta 12” y “Alfa enolasa”.

En conclusión, se ha podido confirmar la presencia de 4 biomarcadores moleculares en gingivitis.

Palabras clave:

Proteómica, Líquido Gingival Crevicular, Gingivitis

ABSTRACT

Gingivitis is the second most common disease of the oral cavity, it is an acute inflammatory process that causes bleeding on probing, irritation, inflammation, and redness of the gums, specifically of the free and interproximal gingiva. The dentist makes the diagnosis clinically.

The aim of this experimental work was to compare 5 samples of patients with gingivitis and healthy patients, obtained from the Gingival Crevicular Fluid (GCF), to find biomarkers in the detection of gingivitis, using Two-dimensional Electrophoresis (2D-PAGE), Mass Spectrometry (MS/MS) and bioinformatics databases (MASCOT, PATTERNLAB).

As a result, four biomarkers for the detection of gingivitis were obtained: "Immunoglobulin Variable Region", "Haptoglobin", "Protocadherin beta 12" and "Alpha enolase".

In conclusion, the presence of 4 molecular biomarkers in gingivitis has been confirmed.

Key words:

Proteomics, Gingival Crevicular Fluid, Gingivitis

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

EPIGRAFE

RESUMEN.

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO	3
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	4
1.1. Determinación del problema.....	4
1.2. Enunciado.....	5
1.3. Descripción.....	5
1.4. Justificación	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo general:.....	9
2.2 Objetivo específico:.....	9
3. MARCO CONCEPTUAL.....	10
3.1. Conceptos Básicos.....	10
3.2. Antecedentes Investigativos.....	21
4. HIPÓTESIS	28
CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	29
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN	30

1.1. Técnicas.....	30
1.2. Instrumentos:	30
1.3. Materiales de Verificación	31
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN	32
2.1. Ubicación Espacial	32
2.2. Ubicación Temporal.....	32
2.3. Población/muestra	32
2.4. Unidades de Estudio (criterios de inclusión/exclusión).....	32
2.5. Consideraciones éticas	33
3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	33
3.1. Organización de la información.....	33
3.2. Recursos.....	33
3.3. Prueba Piloto/Validación del Instrumento	34
4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS	34
4.1. Tipo de procesamiento:.....	34
4.2. Plan de Procesamiento.....	34
4.3. Metodología.....	35
4.4. Plan de Análisis estadístico	40
4.5. Cronograma de Actividades.....	41
CAPÍTULO III: RESULTADOS	42
1. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:	44
1.1 MAPA PROTEICO OBTENIDO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL, GEL 2D (SDS-PAGE):	44
1.2 IDENTIFICACIÓN DE SPOTS PROTEICOS - SECUENCIAS “DENOVO” ESPECTROMETRÍA DE MASAS (ESI-MS/MS).....	46

1.3 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS (LAPS/OB)	47
2. DISCUSIÓN	67
3. CONCLUSIONES:	74
4. RECOMENDACIONES:	75
REFERENCIAS:.....	76
ANEXOS:	83
ANEXO 1: SOLICITUD DIRIGIDA AL COORDINADOR PRINCIPAL DEL LABORATORIO DE QUÍMICA Y PROTEÍNAS DE LA UCSM:.....	83
ANEXO 2: AUTORIZACIÓN DE USO DEL LABORATORIO DE QUÍMICA Y PROTEÍNAS DE LA UCSM:	84
ANEXO 3: INSTRUMENTO – FICHA CLÍNICA	85
ANEXO 4: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UCSM.....	86
ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES EN ESTUDIO.	88
ANEXO 6: FOTOGRAFÍAS LABORATORIALES	90
ANEXO 7: CORRIDA 2D EN SEGUNDA DIMENSIÓN	97
ANEXO 8: FLUJOGRAMA DE TRABAJO	99
ANEXO 9: DOCKING	100

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1. Procedimiento de electroforesis bidimensional	37
FIGURA 2. Obtención de péptidos por uso de espectrometría de masas a partir de Electroforesis Bidimensional	39
FIGURA 3. Secuencias “Denovo” obtenidas a través de Espectrometría de masas.	46
FIGURA 4. Estudio comparativo de homología secuencial de spot P101	62
FIGURA 5. Estudio comparativo de homología secuencial de proteína P102 con otras proteínas de Haptoglobina	63
FIGURA 6. Estudio comparativo de homología secuencial de proteína S201	64
FIGURA 7. Estudio comparativo de homología secuencial de proteína S202	65

ÍNDICE DE TABLAS:

TABLA 1. Masas y secuencias de péptidos obtenidos de los spots proteicos analizados por ESI-MS/MS	50
TABLA 2. Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-p protein search	51
TABLA 3. Proteínas a las que pertenecen los péptidos analizados a partir de Electroforesis Bidimensional	66



INTRODUCCIÓN

La gingivitis es un proceso inflamatorio agudo que produce sangrado al sondaje, se observa irritación, inflamación y enrojecimiento de las encías, específicamente de la encía libre e interproximal. Normalmente no ocasiona dolor, razón por la cual los pacientes retrasan su tratamiento (1).

La gingivitis afecta al 90% de la población (2), es la segunda enfermedad más común en la cavidad bucal, los factores que aumentan el riesgo de su aparición entre ellos malos hábitos de higiene bucal, fumar, deficiencia de vitamina C, malposición dentaria, enfermedades sistémicas como la leucemia, VIH/SIDA, diabetes, tratamiento oncológico, medicamentos como la fenitoína, bloqueadores de los canales de calcio y cambios hormonales (1).

Al ser la gingivitis un proceso agudo, con el tiempo se convierte en proceso crónico, llamado periodontitis, en esta etapa de la enfermedad, empieza la destrucción del periodonto, presenta movilidad dentaria y dolor.

El diagnóstico de la gingivitis se realiza de forma clínica y su tratamiento consiste en un cambio de hábitos dentales, mejora en el cepillado, uso de hilo dental, limpiezas dentales periódicas, realizando el retiro de placa dura y blanda usando ultrasonido y curetas.

La proteómica puede ayudarnos a encontrar una forma de diagnóstico temprana, para evitar que la enfermedad avance.

Esta tesis presenta 3 capítulos, el primero se centra en conceptos base para comprender el experimento a realizar, el segundo capítulo menciona los pasos específicos para la realización del experimento y el procesamiento de datos, el tercer capítulo nos muestra los resultados encontrados y su posterior análisis.





CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del problema.

La gingivitis es un proceso inflamatorio agudo que produce sangrado al sondaje, se observa irritación, inflamación y enrojecimiento de las encías, específicamente de la encía libre e interproximal. Normalmente no ocasiona dolor, razón por la cual los pacientes retrasan su tratamiento (1).

Al ser un proceso inflamatorio agudo, si permanece en el individuo por largos periodos de tiempo, el proceso se convertirá en crónico, dando lugar a la periodontitis.

El diagnóstico de gingivitis está a cargo del odontólogo a través de la evaluación clínica e historial médico. Nuevas propuestas, la prueba de Diagnóstico gingival por detección de Bacterias Gingivales, que se realiza por medio de un frotis de encía, detecta el ADN de Bacterias Gingivales, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *porphyromonas gingivalis*, *prevotella intermedia*, *tannarella forsythia*, *treponema denticola*, *parvimonas micra*, *fusobacterium nucleatum / periodonticum*, *capitobacter rectus*, *eubacterium nodatum*, *eikenella corrodens*, *capnocytophaga spp.* (3).

Sin embargo, los métodos actuales no ayudan a la detección temprana de gingivitis. La mayoría de las enfermedades se manifiestan en los niveles de su actividad proteica. En consecuencia, la proteómica trata de correlacionar directamente la implicancia de proteínas específicas, complejos proteicos y su estado de modificación en un determinado estado de enfermedad.

La caracterización de moléculas en la inflamación gingival puede tener un gran impacto, ya que esto nos ayudaría a detectar los cambios entre el tejido saludable y el tejido gingival inflamado, en la búsqueda de un nuevo método para el diagnóstico oportuno de la gingivitis (2).

1.2. Enunciado

Análisis de expresión por aproximación proteómica de marcadores moleculares en el proceso inflamatorio gingival. Arequipa 2023.

1.3. Descripción

a. *Área de Conocimiento*

- Área General: Ciencias de la Salud.
- Área Específica: Odontología.
- Especialidad: Periodoncia.
- Línea o Tópico: Microbiología, Proteómica.

b. Operacionalización de Variables

Variables	Indicadores	Sub-Indicadores	Sub-indicadores de primer orden
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival inflamado (gingivitis)	Expresión de proteínas asociadas al proceso inflamatorio gingival.	Proteínas diferenciales en ambos mapas de	Expresión de potenciales proteínas modificadas post-traduccionales y análisis de secuencia proteínas por PatternLAB como base de datos.
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival saludable	Expresión de proteínas gingivales en encía en condiciones saludables.	referencia (control y patológico).	Expresión de proteínas propias del tejido gingival y análisis de secuencia de proteínas por PatternLAB como base de datos.

b. Interrogantes Básicas

1. ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica en tejido gingival saludable?
2. ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica en tejido gingival inflamado (gingivitis)?
3. ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica diferencial del tejido gingival saludable con relación al tejido gingival inflamado?

c. Taxonomía de la Investigación (Diseño de la Investigación)

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	1. Por la técnica de recolección	2. Por el tipo de dato que se planifica recoger	3. Por el número de mediciones de la variable	4. Por el número de muestras o población	5. Por el ámbito de recolección		
Cualitativo	Experimental	Prospectivo	Transversal	Comparativo	De laboratorio	Experimental	Explicativo

1.4. Justificación

Originalidad:

La investigación es original. El estudio proteómico comparativo del tejido gingival inflamado con tejido gingival saludable no ha sido investigado extensamente. A nivel mundial existen estudios que hablan sobre el líquido crevicular gingival y bacterias causantes de enfermedades como periodontitis, todo esto relacionado a la proteómica, mas no existen muchos estudios que decodifiquen el tejido gingival inflamado, comparando su aproximación proteómica con el tejido gingival saludable.

Relevancia:

La presente investigación tendrá relevancia científica. Aportará información al campo de la proteómica y la gingivitis. Esta investigación nos mostrará las proteínas que se encuentran exclusivamente en la inflamación gingival/gingivitis, la cual es una de las enfermedades más comunes en relación con la cavidad oral.

Actualidad:

La información que se utiliza para la realización de proyectos se basa en protocolos para la realización de geles, y de otros procedimientos que fueron redactados entre los años 1989 y 2010, pero mantienen su vigencia hasta el día de hoy.

Factibilidad:

El proyecto se considera factible porque el ámbito de recolección del tejido a analizar será de una Clínica local. Los geles para electroforesis se realizarán en el Laboratorio de Química y Proteínas F-401, bajo la supervisión del Dr. Gustavo Obando y colaboración del Dr. Luis Alberto Ponce Soto, especialista en el Área Proteómica, en la Universidad Católica de Santa María. El modelo se enviará a secuenciar y el análisis bioinformático se realizará en el Laboratorio de Química y proteínas en la Universidad Católica de Santa María, bajo el apoyo de la base de datos PatternLAB.

Interés Personal:

Es de mi interés personal realizar un proyecto de investigación experimental enfocado al tema de inflamación gingival, complementado con el análisis bioinformático, al mismo tiempo pretendo optar por el título profesional de Cirujano Dentista.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Analizar la expresión proteómica de marcadores moleculares en el proceso inflamatorio gingival.

2.2 Objetivo específico:

- Determinar el nivel de expresión proteómica de tejido gingival saludable.
- Determinar el nivel de expresión proteómica de tejido gingival inflamado (gingivitis)
- Identificar proteínas diferenciales entre tejido gingival saludable y tejido gingival inflamado (gingivitis)

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. Conceptos Básicos

Herramientas de estudio en la aproximación proteómica:

3.1.1. Electroforesis de proteínas

La electroforesis es un tipo de tecnología utilizado para la separación y análisis de ácidos nucleicos, proceso usado en el laboratorio para lograr el aislamiento y manipulación de los fragmentos clonados de ADN. También se le conoce como un componente crítico en varios protocolos de la biología molecular que evalúan el papel y la interacción de los ácidos nucleicos en células y tejidos (4).

3.1.1.1. SDS-PAGE o 1D SDS-PAGE:

“Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis” (SDS-PAGE) es un método comúnmente utilizado para la obtención de una separación de alta resolución en la mezcla de proteínas complejas. Este método inicialmente desnatura las proteínas que van a pasar por el proceso de electroforesis. A pesar de que las características estructurales covalentes de las proteínas resueltas pueden determinarse con SDS-PAGE, las propiedades funcionales son destruidas, esta destrucción incluye la presencia de iones metálicos unidos de forma no covalente.

El uso de “SDS-PAGE” es la forma tecnológica más común de obtener una separación analítica de alta resolución de mezclas de proteínas (5).

El SDS es un detergente que desnatura las estructuras secundarias y terciarias no disulfuradas y las recubre con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, lo que permite estimar los pesos moleculares (6).

3.1.1.2. Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)

El gel de electroforesis bidimensional (2-DE o 2D-PAGE) es una técnica primaria que se utiliza en proteómica. Se logra la separación de la mezcla compleja de muestras usando 2 diferentes propiedades de la proteína. En la primera dimensión, también llamada “isoelectric focusing” (IEF), las proteínas son separadas por el valor de puntos isoeléctricos (pI) y en la segunda dimensión consiste en SDS-PAGE, donde las proteínas son separadas por el peso molecular relativo (7).

-Primera dimensión: Isoelectric focusing (IEF)

En la primera dimensión se separan las proteínas dependiendo de los puntos isoeléctricos de las proteínas. El pI se define como el pH de una solución cuya carga neta de proteínas es igual a cero. Una proteína con una carga neta positiva va a migrar hacia el cátodo, volviéndose menos cargada positivamente hasta alcanzar su pI. Mientras que una proteína con una carga neta negativa va a migrar hacia el ánodo, volviéndose menos cargada negativamente hasta que también alcance su pI (Ilustración 1).

Es decir, se carga una mezcla de proteínas en el extremo básico del gel de gradiente de pH. Después de aplicar un campo eléctrico, las proteínas se separan en función de las cargas, concentrándose en las posiciones en las que el valor pI es equivalente al pH circundante. Las proteínas más grandes se moverán más lentamente a través del gel, pero con tiempo suficiente alcanzarán a las proteínas pequeñas de igual carga (9).

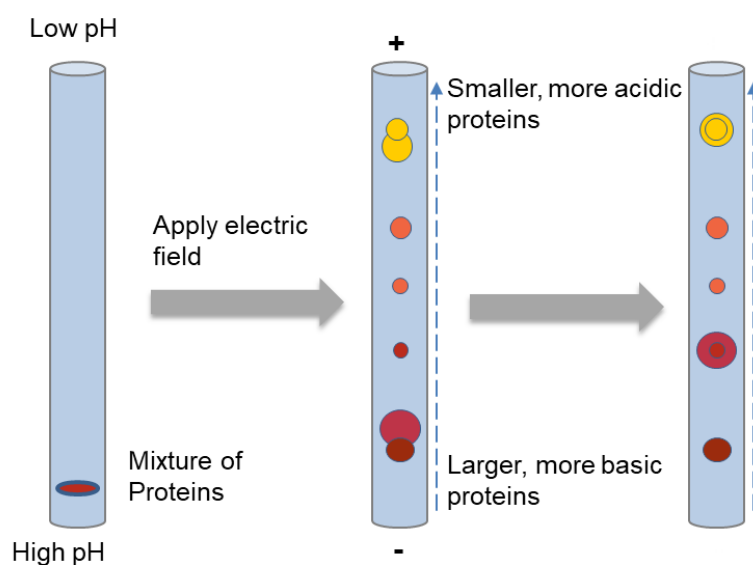


Ilustración 1 (8)

-Segunda dimensión: SDS-PAGE:

En la segunda dimensión la separación ocurrirá en un sistema plano o vertical sobre el gel de la placa. En esta segunda dimensión se utiliza SDS-PAGE, de tal forma que proteínas más pequeñas migrarán más rápidamente ya que presentarán menos resistencia (Ilustración 2) (10).

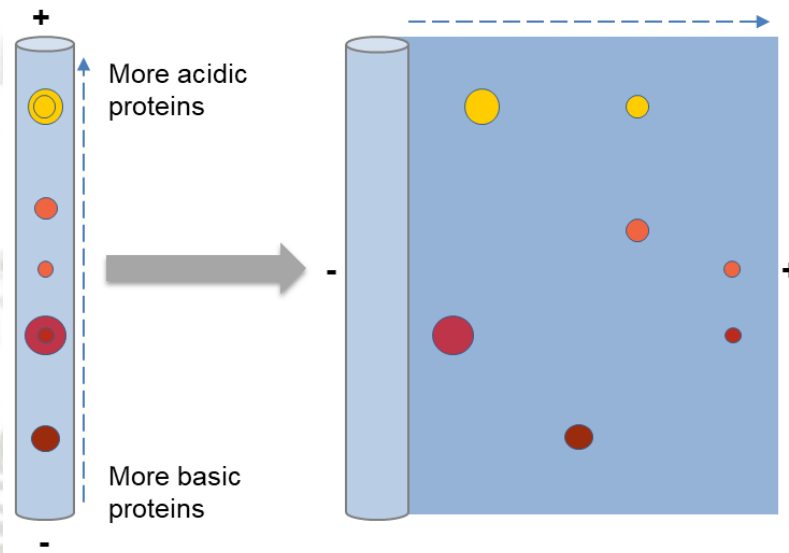


Ilustración 2 (8)

3.1.2. Espectrometría de masas: (MS/MS)

Espectrometría de masas es una técnica analítica que provee información ya sea cualitativa (estructura) y cuantitativa (concentración o masa molecular) respecto al análisis molecular después de su conversión a iones.

Las moléculas de mayor interés son las primeras en ser introducidas en la fuente de ionización del espectrómetro de masas, donde se ionizan para obtener una carga positiva o negativa. Después, los iones viajan a través del analizador de masa y llega a diferentes partes del detector dependiendo de su relación masa/carga (m/z).

Luego de que los iones hagan contacto con el detector, se generan señales las cuales son grabadas por un software. El software muestra las señales de forma gráfica como un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z (11).

3.1.2.1. Ionización por electrospray (ESI)

La Ionización por electrospray (ESI) utiliza energía eléctrica para ayudar a la transferencia de iones desde una solución a su fase gaseosa antes de que sea sometido al análisis de espectrometría de masas. De esta forma, las especies iónicas pueden ser analizadas por ESI/MS con una sensibilidad aumentada.

Últimamente, la ESI ha emergido como una técnica importante en laboratorios clínicos, ya que es una herramienta sensible, robusta y confiable para estudios a diferencia de otras técnicas. Junto con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el fraccionamiento molecular previo al análisis por espectrometría de masas, la HPLC y la ESI-MS se ha convertido en técnicas poderosas, capaces de analizar moléculas grandes y pequeñas de diversas polaridades en una muestra biológica compleja. (Ilustración 3) (11).

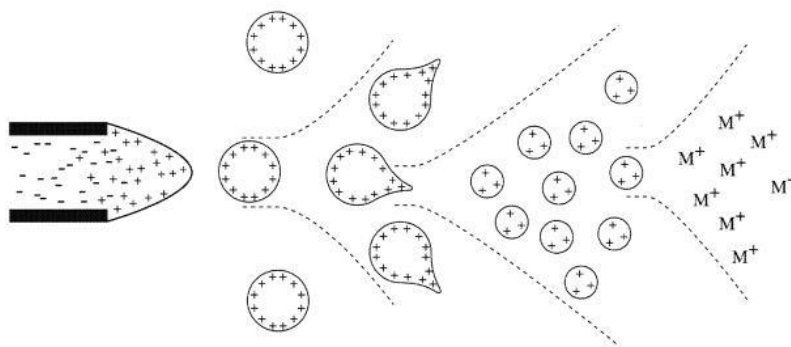


Ilustración 3. (12)

3.1.3 Secuenciamiento de proteínas:

En proteómica existen varias técnicas que involucra distintas metodologías experimentales como Electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Las uniones de las técnicas anteriormente mencionadas se utilizan para el estudio proteico de varios organismos. Asimismo, suelen existir complejidades en las muestras que podrían afectar su posterior procesamiento y análisis como por ejemplo el alcance dinámico de la expresión y otros problemas de detección de proteínas asociadas a la membrana (13).

Definimos la secuenciación de proteínas como un proceso que se ejecuta de forma práctica, con el cual se determina la secuencia de aminoácidos de un parte o toda la proteína. Este proceso sirve para identificar las proteínas.

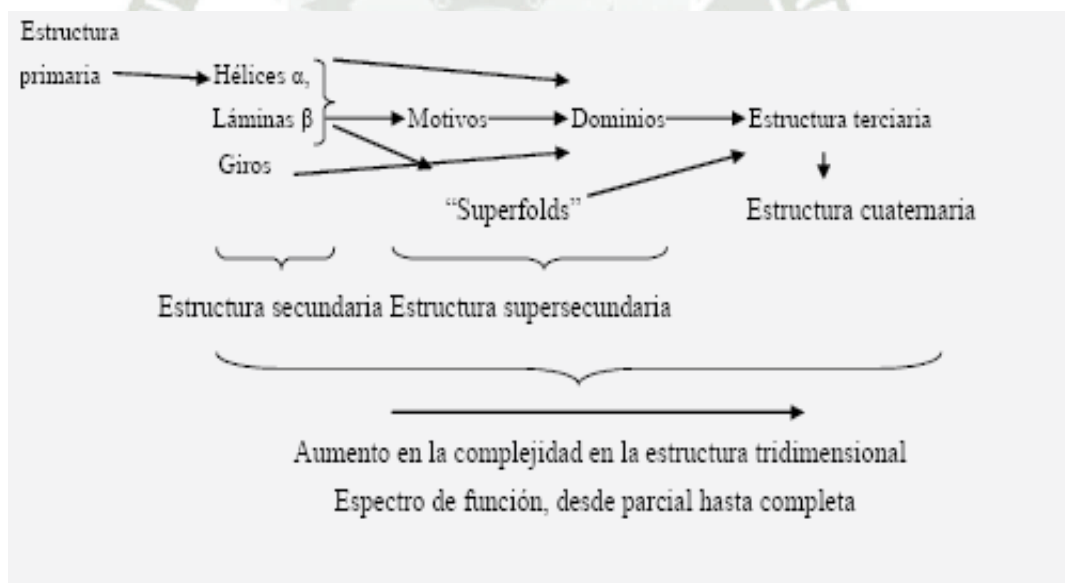


Ilustración 4 (14)

La estructura primaria de la proteína, la compone una secuencia de aminoácidos enunciada en una secuencia lineal compuesta por letras mayúsculas, las cuales representan cada uno de los aminoácidos que componen las proteínas, al mismo

tiempo, describe la posición de los puentes disulfuro e indica cual es el aminoácido N-terminal y C-terminal, finalmente se da números a dichos aminoácidos (14).

La estructura secundaria que compone a una proteína incluye la organización o arreglo espacial de partes de la secuencia de aminoácidos. En esta estructura, algunas secuencias de aminoácidos se organizan como: hélices á, láminas â o giros, estas 3 son las más comunes, mas no las únicas.

El entendimiento de la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas suele ser complicado, más en algunos artículos la definen como parte esencial para que la proteína pueda cumplir su función completa en la naturaleza (14).

3.1.4 Biomarcadores moleculares relacionados a Inflamación Gingival:

Los marcadores moleculares son moléculas que forman parte de una muestra tomada de un organismo o materia. También pueden definirse como biomoléculas que pueden ser relacionadas con un rasgo genético. Un ejemplo de marcadores moleculares son las proteínas, incluyendo antígenos e isoenzimas; y el ADN, incluyendo genes conocidos o fragmento de secuencia.

Un marcador molecular monomórfico es el mismo es todos los organismos estudiados, cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, en sitios de restricción o de estructura, se denomina polimórfico.

Respecto a la inflamación gingival, en estudios realizados por Persson y colaboradores, se encontró que el nivel del ATS en Fluido Gingival Crevicular “fue significativamente elevado en sitios con pérdida de inserción, además asoció los valores máximos de ATS con Inflamación gingival severa” (15).

Al mismo tiempo, en una investigación realizada por Oringer y colaboradores “se demostró niveles elevados de ATS en Fluido Gingival Crevicular en sitios que no presentaron pérdida de inserción, esta alta prevalencia de sitios positivos con AST debido a la inflamación gingival, disminuyó la capacidad para distinguir entre sitios con progresión de la enfermedad y sitios estables pero inflamados” (16).

Palys y colaboradores “relacionaron los niveles de ICTP en Fluido Gingival Crevicular con la microflora oral en varios estados de enfermedad. Sus estudios mostraron que los niveles de ICTP diferían significativamente entre los sujetos sanos, los que tenían gingivitis y los que presentaban periodontitis, siendo estos últimos los que presentaban niveles más altos de ICTP” (17).

3.1.5 Inflamación gingival:

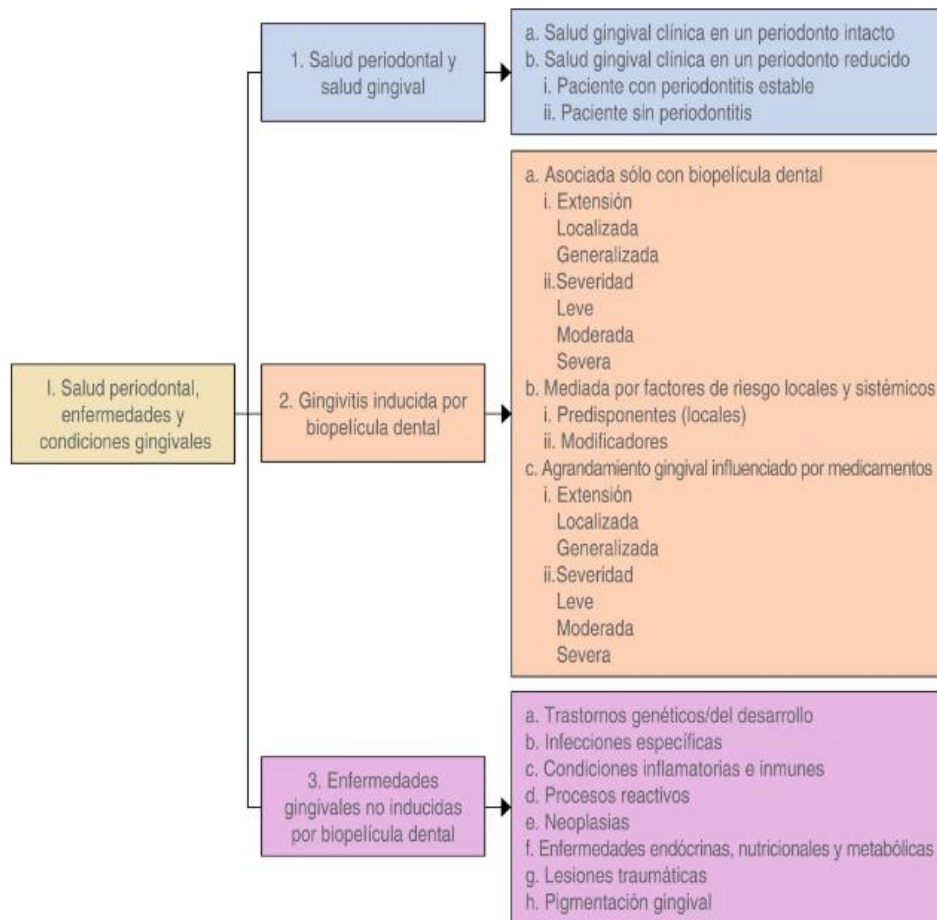


Ilustración 5 (18)

3.1.5.1 Salud periodontal:

Es el estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria, es decir, la ausencia de inflamación asociada a gingivitis, periodontitis o alguna otra condición periodontal, siendo esto diagnosticado de forma clínica. Se requiere diferenciar el tipo de salud periodontal, pudiendo ser dividido en dos:

-Salud gingival clínica en un periodonto intacto: periodonto estructural y clínicamente sano, en donde no se encuentra inflamación y/o destrucción del tejido periodontal (18).

-Salud gingival clínica en presencia de un periodonto reducido: Caracterizada por no presentar eritema y edema en la encía, y al no presentar sangrado al sondaje en presencia de un nivel de inserción y óseo reducidos (18).

Se define como salud gingival en un periodonto intacto o en periodonto reducido cuando se presente menos del 10% de los sitios de sangrado y profundidad de sondaje menor o igual a 3mm (18).

3.1.5.2 Gingivitis inducida por biopelícula dental:

a) Gingivitis asociada sólo con biopelícula dental:

Lesión inflamatoria resultado de las interacciones entre biopelícula dental y la respuesta inmune-inflamatoria del hospedero, abarca solo la encía sin afectar la inserción periodontal (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar) Los signos más frecuentes suelen ser eritema, inflamación gingival, edema, sangrado y halitosis (18).

b) Gingivitis mediada por factores de riesgo locales y sistémicos:

Los factores predisponentes de este tipo de gingivitis incluyen acumulación de biopelícula dental y los factores modificadores son los agentes o condiciones que alteran la forma en la que el individuo responde a la presencia de biopelícula subgingival, por ejemplo: enfermedades sistémicas, tabaquismo y medicamentos (18).

c) Agrandamiento *gingival influenciado por medicamentos.*

El agrandamiento gingival suele ser casado por medicamentos, por ejemplo, antiepilépticos como fenitoína, valproato de sodio; e inmunoreguladores como la ciclosporina, ambos grupos de medicamentos producen una mayor acumulación de biopelícula dental y en resultado, una inflamación gingival más severa.

3.1.5.3 Enfermedades gingivales no inducidas por biopelícula dental:

Suelen ser manifestaciones de condiciones sistémicas, que se manifiestan debido a cambio patológicos en los tejidos gingivales (18).

Incluyen:

- Trastornos genéticos o del desarrollo.
- Infecciones específicas.
- Condiciones y lesiones inflamatorias e inmunes.
- Procesos reactivos.
- Neoplasias.
- Enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas.
- Lesiones traumáticas.
- Pigmentación gingival.

3.2. Antecedentes Investigativos

3.2.1. Antecedentes internacionales:

Título: Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis

Autores: Barros S., Williams R., Offenbacher S. y Morelli T.

Fuente: Periodontol 2000, 2016, 70(1):53–64. Publicado en febrero del 2016, doi: 10.1111/prd.12107

Análisis: Los fluidos gingivales pueden ser fácilmente colectados, contienen biomarcadores locales y sistémicos. Los fluidos orales podrían ofrecer una base para una prueba diagnóstica de detección de la enfermedad periodontal. El Líquido Gingival Crevicular es un líquido fisiológico al igual que un exudado inflamatorio originario del plexo gingival de vasos sanguíneos del corion gingival, subyacente al epitelio que recubre el espacio dentogingival. En un principio, estudios indicaban que el Líquido Gingival Crevicular era un exudado inflamatorio, sin embargo, existen pruebas que sugieren que es un trasudado sérico alterado que sólo se convierte en un exudado inflamatorio cuando la enfermedad está clínicamente presente. El objetivo de esta revisión es describir la evolución histórica del líquido crevicular gingival como marcador diagnóstico de la enfermedad periodontal y su aplicación actual para diagnosticar y predecir la actividad.

La recolección del Líquido Gingival Crevicular se realiza por medio de tiras de papel filtrante “Periopaper”, la cual se realiza por un periodo de 30 segundos. Posterior a su recolección miden la cantidad total de mediador recogido en la tira mediante elución seguida de biomarcador específico, como un inmunoensayo enzimático. Otros estudios informan de la recogida de líquido gingival crevicular en tiras de papel y la medición de la cantidad de líquido recogido, normalmente utilizando un

instrumento “Periotron” que mide el volumen de líquido crevicular gingival recogido, permitiendo así calcular la concentración de mediador dentro de la muestra.

Respecto al análisis proteómico de Líquido Gingival Crevicular para la búsqueda de biomarcadores, Zelko y colaboradores analizaron las proteínas del fluido crevicular gingival en el fluido crevicular gingival de individuos periodontalmente sanos utilizando un método sin gel y describieron las proteínas descompuestas en pequeños fragmentos peptídicos y analizadas directamente mediante análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem. Los autores hallaron un total de 327 proteínas en el líquido crevicular gingival y sugirieron que podían utilizarse como referencia en futuros estudios proteómicos en busca de biomarcadores de enfermedades periodontales en el líquido crevicular gingival (19).

Título: Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on highthroughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization.

Autores: Baliban R., Sakellari D., Li Z., Guzman Y., Garcia B. y Floudas C.

Fuente: J Clin Periodontol, 2013, 40(2):131–9. Publicado en febrero del 2013. Doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23190455/>

Resumen: El objetivo de la investigación es identificar la(s) combinación(es) óptima(s) de biomarcadores basados en proteómica en muestras de líquido crevicular gingival (LCG) de individuos con periodontitis crónica (PC) y periodontalmente sanos y validar las predicciones mediante conjuntos de pruebas conocidas y ciegas.

Material y métodos: Se recogieron muestras de GCF de 96 sujetos con periodontitis crónica y periodontalmente sanos y se analizaron mediante cromatografía líquida, espectrometría de masas en tándem y el algoritmo PILOT_PROTEIN. A continuación, se desarrolló un “Modelo de optimización lineal de enteros mixtos” (MILP) para identificar la combinación óptima de biomarcadores que pudiera distinguir claramente una muestra de sujeto ciego como sana o enferma.

Resultados: Se llevó a cabo una validación cruzada exhaustiva de la capacidad del modelo MILP en un conjunto de 55 muestras y se obtuvo una precisión superior al 99% a la hora de clasificar las muestras del conjunto de prueba como sanas o enfermas. Se describieron G3P_HUMAN, TYPH_HUMAN y KV101_HUMAN como biomarcadores proteicos humanos del estado periodontal sano. La proteína KV101_HUMAN (Ig kappa chain V-I region AG) se observó en la mayoría de las muestras periodontales sanas, pero en pocas de las muestras de periodontitis.

A continuación, el modelo se entrenó con las 55 muestras y se probó en dos conjuntos de pruebas ciegas diferentes. Utilizando una combinación óptima de 7 proteínas humanas y 3 proteínas bacterianas, el modelo fue capaz de predecir correctamente 40 de las 41 muestras sanas y enfermas.

Conclusiones: El análisis proteómico a gran escala propuesto y el modelo MILP condujeron a la identificación de combinaciones novedosas de biomarcadores para el diagnóstico consistente del estado periodontal con una precisión predictiva superior al 95% (20).

Título: Application of Label-Free Absolute Quantitative Proteomics in Human Gingival Crevicular Fluid by LC/MS

Autores: N. Bostanci, W. Heywood, K. Mills, M. Parkar, L. Nibali, and N. Donos.

Fuente: Journal of Proteome Research. 2010. 9, 2191–2199. Publicado el 3 de mayo del 2010. Doi: 10.1021/pr900941z

Resumen: Las enfermedades periodontales son las enfermedades infecciosas más frecuente de encontrar en los humanos. El fluido crevicular gingival (GCF) es un exudado inflamatorio local de los tejidos periodontales. La recolección de GCF es rápida y no invasiva, pero anteriormente los enfoques para analizar su composición se han basado principalmente en biomarcadores de una sola proteína. El propósito de este estudio fue realizar un análisis de exudado de GCF proveniente de periodonto sano, esto realizado con LC/MSE, un método de espectrometría de masas sin etiquetas que permite la identificación simultánea de proteínas y su cuantificación absoluta en fluidos biológicos.

Material y métodos: A partir de un estudio de casos y controles, se eligieron 10 sujetos para el análisis del proteoma del GCF, 5 pacientes presentaban un tejido gingival saludable, y 5 pacientes presentaban periodontitis agresiva generalizada (G-AgP). Se obtuvieron 4 muestras de cada paciente, siendo un total de 20 muestras de GCF de sujetos sanos y 20 muestras de pacientes con periodontitis agresiva generalizada (G-AgP). Las muestras se obtuvieron usando Periopaper, siendo introducidos en las bolsas periodontales por 30 segundos, se desecharon las muestras con sangre.

El volumen de las muestras de GCF se midieron con un Periotron 8000 calibrado y, a continuación, las lecturas se convirtieron en un volumen real (μL) por referencia

a la curva estándar. Posteriormente se realizó la centrifugación de las muestras y se realizó la cuantificación por medio de espectrometría de masas.

Las proteínas del GCF se identificaron y cuantificaron. Todos los análisis se realizaron con un HPLC nanoAcquity y un espectrómetro de masas Q-TOF Premier.

Para el procesamiento de datos y búsqueda en bases de datos, se utilizó ProteinLynx GlobalServer versión 2.3.

Resultados: Informaron de que las proteínas del líquido crevicular gingival cistatina-B y alfa defensina 1 sólo se detectaron en las muestras de control sanas y también que la anexina-1 se detectó a niveles cinco veces superiores en las muestras de individuos periodontalmente sanos. La L-plastina sólo se detectó en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis agresiva. La L-plastina es una proteína de unión de actina que se expresa exclusivamente en los leucocitos y desempeña un papel crucial en los acontecimientos inmunomediados. Se ha demostrado que esta proteína también está elevada en la periodontitis crónica. Su valor como marcador de la enfermedad periodontal aún debe ser evaluado.

Conclusiones: Los resultados del presente estudio demuestran que la tecnología de espectrometría de masas cuantitativa sin laboratorio basada en LC/MSE es una plataforma adecuada para el análisis del proteoma del GCF. El contenido proteico del GCF podría utilizarse potencialmente como ayuda diagnóstica en la enfermedad periodontal, ya que la caracterización del proteoma del GCF aumentará en gran medida la importancia clínica de este exudado biológico (21).

Título: The prominent proteins expressed in healthy gingiva: a pilot exploratory tissue proteomics study.

Autores: E. Yaprak, M. Kasap, G Akpınar, S. Kayaalti-Yuıksek, A. Sinanogılu, N. Guzel, H Demirturk Kocasarac.

Fuente: The Society of The Nippon Dental University. 2018. Publicado el 5 de abril del 2017. 106(1):19-28. doi: 10.1007/s10266-017-0302-9.

Resumen: La encía es un tejido único que protege los tejidos periodontales subyacentes de agresiones mecánicas y bacterianas constantes. Es probable que el análisis molecular de la encía mejore nuestra comprensión de los procesos biológicos subyacentes. El objetivo de este estudio exploratorio preliminar es analizar el perfil proteómico de la encía sana y detectar las proteínas más expresadas.

Se obtuvieron muestras de tejido gingival de individuos periodontalmente sanos que se sometieron a un procedimiento quirúrgico de alargamiento de corona. Tras aislar las proteínas, se prepararon geles de electroforesis bidimensional en gel (2DE) para cada muestra y sólo se seleccionaron las manchas de proteínas comunes a todos los geles para eliminar el sesgo causado por el efecto de los individuos en el perfil proteómico. Tras la 2DE, se procedió a la digestión trípica en gel y a los pasos MALDI-TOF/TOF para la identificación de las proteínas. Se identificaron con éxito 47 proteínas. Las proteínas identificadas se clasificaron en función de sus clases, funciones moleculares e implicación en procesos biológicos y rutas metabólicas.

Material y métodos:

Este estudio ha sido aprobado por el comité de Ética de la universidad de Kocaeli. Se eligieron a 6 participantes sanos, no fumadores, con periodonto sano (sin sangrado), 3 hombres y 3 mujeres, quienes llegaron a la facultad de odontología para alargamiento de corona (SCLP).

Se obtuvieron muestras de tejido gingival de los individuos. Tras aislar las proteínas, se prepararon geles de electroforesis bidimensional (2D-PAGE) para cada muestra y sólo se seleccionaron las manchas de proteínas comunes a todos los geles para eliminar el sesgo. Tras la electroforesis bidimensional, se realizó la digestión trípica en el gel y se siguieron los pasos de MALDI-TOF/TOF para la identificación de las proteínas.

Resultados: Las proteínas extraídas de las muestras de tejido gingival se sometieron primero a SDS-PAGE. Utilizando unidades de diálisis, pudimos obtener bandas de SDS-PAGE bien separadas. Finalmente, probamos el método de precipitación con acetona para limpiar las muestras y ejecutar los geles 2DE.

Se produjo un mapa de gel. El número de manchas que coincidieron de forma fiable con cada miembro fue de 96, con un coeficiente medio global del 60%. Para caracterizar mejor las manchas de proteínas conservadas, se cortaron las manchas de un gel preparativo con un instrumento automatizado de corte de manchas y se sometieron a digestión trípica en gel seguida de análisis MALDI TOF/TOF. En conjunto, se identificaron 47 manchas proteicas. Las proteínas identificadas se clasificaron según sus funciones moleculares, su implicación en procesos biológicos, clases de proteínas y rutas metabólicas.

Conclusiones: El perfil proteómico de la encía refleja sus características altamente dinámicas. A pesar de la complejidad del proteoma del tejido gingival, el 2DE-PAGE fue un método eficaz para estudiar el perfil de expresión proteica común de la encía. Teniendo en cuenta la importancia de la encía en la formación de enfermedades periodontales, es importante generar un mapa proteómico detallado del tejido gingival para establecer un puente entre los acontecimientos moleculares y la formación de la enfermedad. Este estudio estableció un mapa proteómico proteoma inicial del tejido gingival de individuos sanos (22).

3.2.2. Antecedentes nacionales:

No se han encontrado antecedentes nacionales.

3.2.2. Antecedentes locales:

No se han encontrado antecedentes locales.

4. HIPÓTESIS

Dado que las proteínas se expresan de forma distinta en cada proceso inflamatorio, **es probable** que haya diferencia entre la expresión proteica del tejido gingival inflamado respecto al tejido gingival saludable.

Hipótesis nula:

No existe diferencia entre la expresión proteica del tejido gingival inflamado respecto al tejido gingival saludable.



CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnicas

En la presente investigación se empleará la técnica observación y medición usando el instrumento, electroforesis bidimensional y espectrometría de masas para el análisis y comparación de la proteómica del tejido gingival inflamado (gingivitis) y tejido gingival saludable.

CUADRO DE TÉCNICAS E INSTRUMENTOS		
VARIABLES	TÉCNICA	INSTRUMENTO
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival inflamado (gingivitis)	Observación y Medición	Electroforesis bidimensional, Espectrometría de masas y base de datos PatternLAB.
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival saludable		

1.2. Instrumentos:

1.2.1 Instrumentos documentales:

- Carta de presentación al decano de la facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María.
- Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM (**ANEXO 1 y 2**).

1.2.2. Instrumentos mecánicos:

- Muestra de tejido gingival sano
- Muestra de tejido gingival inflamado (gingivitis)

- Equipo de Isoelectroenfoque
- Equipo de Electroforesis Bidimensional
- Gel Bidimensional para tinción
- Escáner de Fluorescencia
- Sistema de adquisición de imágenes fluorescencia y UV
- Software de análisis
- Equipo de bioseguridad (guantes, lentes, mascarilla)
- Espectrómetro de Masas

1.3. Materiales de Verificación

- Fichas clínicas y/o laboratoriales (**ANEXO 3**).
- Cámara fotográfica.
- Computadora, laptop y/o tablet.
- Útiles de escritorio
- Software PDQuest
- Software DNASTAR y sus herramientas (EditSeq, Megalign)
- Base de datos NCBI usando el software BLAST-p protein search (PatternLab, Mascot)

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación Espacial

La investigación se realizará en el Laboratorio de Química de Proteínas (LAQUIP) de la Universidad Católica de Santa María, institución ubicada en Yanahuara, Arequipa-Perú

2.2. Ubicación Temporal

Esta investigación se realizará entre el mes de febrero y abril del año 2023, será una investigación de corte transversal, por lo tanto, las variables se estudiarán en un solo periodo de tiempo.

2.3. Población/muestra

En la presente investigación se estudiará 5 muestra de tejido gingival saludable y 5 muestra de tejido gingival inflamado (gingivitis)

- **Población A:** 5 muestra de tejido gingival saludable
- **Población B:** 5 muestra de tejido gingival inflamado (gingivitis)
- **Técnica de muestreo no probabilístico:** muestreo por conveniencia

2.4. Unidades de Estudio (criterios de inclusión/exclusión)

Criterios de inclusión:

- Tejido gingival inflamado producto de gingivitis
- Tejido gingival saludable

Criterios de exclusión:

- Tejido gingival inflamado producto de periodontitis moderada

- Tejido gingival inflamado producto de periodontitis avanzada

2.5. Consideraciones éticas

El presente trabajo tiene como objetivo analizar la proteómica de tejidos dentales inflamados (gingivitis) utilizando una muestra extraída del ser humano de tejido con gingivitis, la cual se tomará de una clínica local, siendo este un proceso muy sencillo que no pone en riesgo la vida del ser humano.

- Autorización del Comité de Ética de Investigación de la UCSM (**ANEXO 4**).

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización de la información

Antes de iniciar el estudio será necesario:

- Autorización del Comité de Ética de Investigación de la UCSM (**ANEXO 4**).
- Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM (**ANEXO 1 y 2**).
- Consentimiento informado para los pacientes en estudio (**ANEXO 5**).
- Coordinación con los encargados del laboratorio específico.

3.2. Recursos

Físicos: Ambiente físico del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM.

Humanos: El equipo de investigación se compone de:

- Estudiante: Tejada Alférez Viviana Fernanda.
- Asesor: Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda.
- Co-Asesor: Professor. Luis Alberto Ponce Soto PhD.

Económicos: Se obtendrán las unidades de estudio (experimentación), a través de muestra obtenida de una clínica local. Los recursos económicos son propios de la investigadora para el uso del laboratorio.

3.3. Prueba Piloto/Validación del Instrumento

Debido al tamaño de la población y muestra no se realizará prueba piloto.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

4.1. Tipo de procesamiento:

Se empleará un procesamiento computarizado utilizando la base de datos NCBI usando el software BLAST-p protein search, el cual cuenta con programas como Mascot y Pattern lab, para el análisis de secuencia.

4.2. Plan de Procesamiento

-Clasificación: la información obtenida de los instrumentos aplicados será ordenada en una matriz de sistematización

-Codificación: para el procesamiento computarizado será necesario haber realizado el análisis de proteómica de las muestras.

-Coteo: no se utilizará conteo

-Tabulación: se elaborará tablas de doble entrada

-Graficación: no se elaborarán gráficos.

4.3. Metodología

A. *Clínico*

a) Población de estudio:

El estudio se realizará recolectando 5 muestras de pacientes con encías saludables y 5 muestras de pacientes con inflamación gingival (gingivitis).

b) Procedimiento clínico:

La obtención de muestras se realizará de la siguiente forma. Utilizando conos de papel, se recolectará una muestra de Líquido Gingival Crevicular de los sitios interproximales de cada uno de los dos dientes maxilares no molares. Cada sitio será muestreado tres veces con intervalos de 1 min entre muestras repetidas. La muestra será descartada si se observa sangrado, se esperará 15 minutos y se repetirá.

B. *Procesamiento de muestra*

a) **Electroforesis Bidimensional (SDS-PAGE 2D).**

Según el protocolo descrito por O'Farrell, los geles en dos dimensiones serán realizados de la siguiente manera: Para la primera dimensión se utilizarán tiras de gradiente de pH IpG de General Electric (Estados Unidos), con un rango de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos (23):

Rehidratación:

18 horas en una solución buffer DeStreak™ (GE Health Care Amersham Biosciences) que contiene: urea, tiourea, CHAPS y 1% de anfolitos con rango lineal

de pH 3 a 10; en esta solución se disolverán los extractos proteicos. En cada caso se colocó un volumen de extracto que correspondía aproximadamente a 15 μ g de proteínas (24).

Equilibración:

Dos incubaciones de 15 minutos cada una con ditiotreitol al 1% en buffer de equilibrio (úrea, Tris-HCl, glicerol, SDS y azul de bromofenol) y otra con una solución de iodoacetamida al 4% en buffer de equilibrio (24).

Enfoque:

Finalmente, las tiras se colocarán en una cámara de isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan IPGphor (GE Health Care Amersham Biosciences) y las especificaciones del fabricante. Para la segunda dimensión, las tiras serán acopladas a geles de poliacrilamida al 12% y de 1 mm de espesor (según indicaciones antes mencionadas) con agarosa 0,5% y se realizará la electroforesis en una cámara Mini-protean II BIORAD. Utilizando buffer Trisglycine-SDS a 200V. Los spots de proteínas serán visualizados con tinción de plata PlusOne™ (Amersham Bio-Sciences). Los geles se realizarán por triplicado para cada ensayo (24).

Análisis de Imágenes

Posterior a la tinción de geles, se realizará un análisis comparativo de los mismo utilizando un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos) modelo ProXCISION. Las imágenes obtenidas de forma digital se analizarán usando el programa Phoretix 2D versión 2004. Este programa realizará una comparación de imágenes digitales de los geles, y permitirá analizar los geles de electroforesis bidimensionales y determinar la presencia de manchas o spots comunes. Los

resultados del experimento serán digitalizados e introducidos como referencia para el análisis de los geles, con la finalidad de ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicarán las proteínas de interés, y se utilizarán valores teóricos de punto isoeléctrico y masa molecular para calibrar todo el experimento (ANEXO 8).

b) Espectrometría de masas.

Parámetros UPCC-Xevo G2-XS QTOF para los estudios de Espectrometría de Masas.

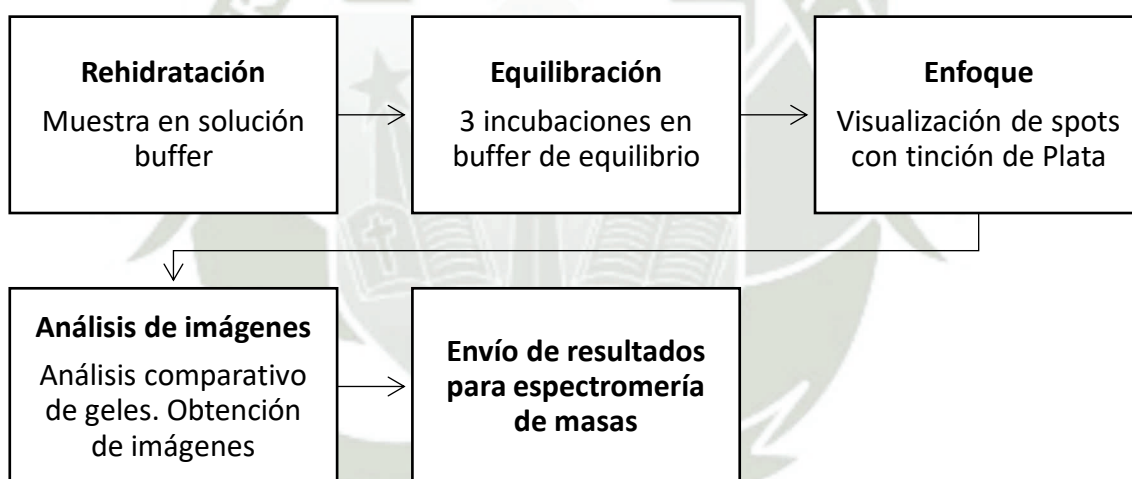


Figura 1. Procedimiento de electroforesis bidimensional

Sobre la base de experimentos preliminares, las condiciones experimentales finales se determinarán de la siguiente manera: Sistema de fase líquida: ACQUITY UPCC; columna: Torus 2-PIC, 3,0 × 100 mm, 1,7 μm; fase móvil A: CO₂, fase móvil B: metanol acetonitrilo = 9:1; temperatura de la columna: 55°C, ABPR: 2600 psi; solución de compensación: solución de metanol con formiato de amonio 0,5 mM;

velocidad de flujo: 0,5 ml/min; y volumen de inyección: 0,3 μ L. El programa de gradiente se utilizará con un caudal de 1,0 ml/min y será el siguiente: 0–2 min (1 % B), 2–7 min (1 %–5 % B), 7–10 min (5 % B), y 10–13 min (5%–1% B).

Las condiciones para la espectrometría de masas son las siguientes:

Sistema de espectrometría de masas: Xevo G2-XS QTOF; método de ionización: ESI +/-; modo de adquisición de datos: MS E; Energía de impacto MS E: baja, apagada, alta, 20–50 eV; ion cuantitativo: m/z 902,8177; rango de masa de recolección: 100–1200 Da; tensión capilar: 2,0 kV; tensión de orificio cónico: 40 V; temperatura de la fuente de iones: 120 °C; temperatura de atomización: 500°C; caudal de gas de cono: 50 L/h; y caudal de gas atomizado: 1000 L/h. La calibración de los datos se realizó utilizando una referencia externa (LockSpray) con la infusión constante de solución de leucina-encefalina (200 pg/ μ L) a un caudal de 5 μ L/min. El software de procesamiento de datos incluía UNIFI 1.9.4 y Masslynx V 4.1.

Adquisición y análisis de datos

Xevo G2-XS QTOF utiliza la tecnología patentada LockSpray para garantizar la precisión de los datos recopilados en tiempo real. Se pueden obtener números de masa de alta precisión, y la combinación de números de masa de alta precisión y distribución de isótopos e información de fragmentos secundarios proporciona fórmulas moleculares con precisión. Xevo G2-XS QTOF aplica la tecnología MS-E patentada para obtener la información espectral de masas primaria y secundaria de los compuestos para una mayor confirmación estructural con una inyección al mismo tiempo. El modo ESI +/- se utiliza para el análisis de péptidos y

aminoácidos. El primer paso consistirá en comprender el patrón de fragmentación de los péptidos, previamente digeridos por proteasas en su conjunto. En el segundo paso, al combinar los patrones de fragmentación y consultar la literatura relacionada, se establecerá una base de datos MASCOT para el análisis de secuencia de proteínas. En el tercer paso, la base de datos autoconstruida se importará a MASCOT.

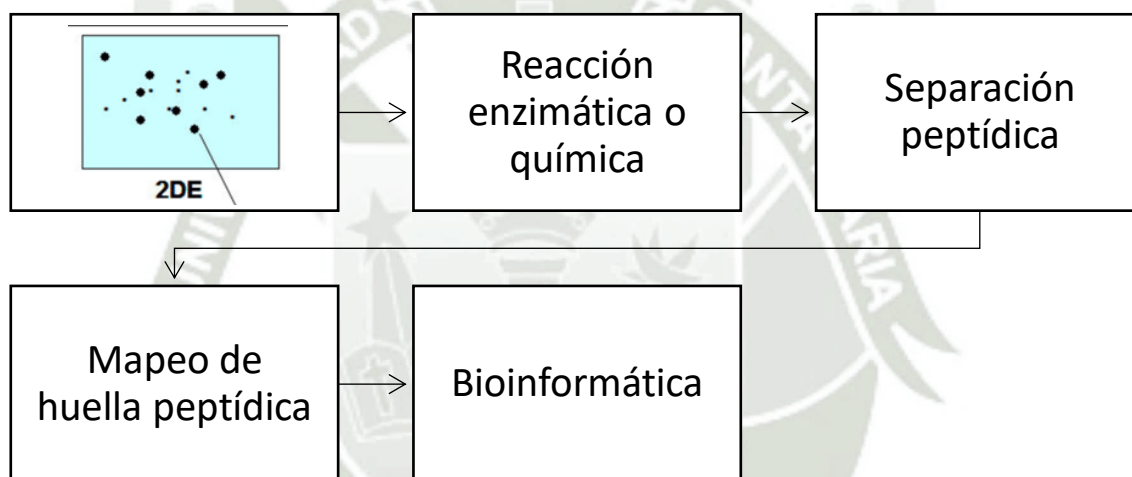


Figura 2. Obtención de péptidos por uso de espectrometría de masas a partir de Electroforesis Bidimensional

4.4. Plan de Análisis estadístico

VARIABLE INVESTIGATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA POR ESCALA DE MEDICIÓN	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA (Medidas de tendencia central y de dispersión)	ESTADÍSTICA
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival inflamado (gingivitis)	Cualitativo	Nominal	Ninguna	Ninguna
Nivel de expresión proteómica en tejido gingival saludable				

4.5. Cronograma de Actividades

Año 2022/2023	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE (2023)
Formulación del plan de tesis					
Recolección de muestras					
Procesamiento de muestras:					
<ul style="list-style-type: none"> ○ Ensayo en Electroforesis de una sola dimensión (SDS-PAGE) 					
<ul style="list-style-type: none"> ○ Ensayo en Electroforesis Bidimensional (2D-PAGE) 					
<ul style="list-style-type: none"> ○ Análisis por Espectrometría de Masas (MS/MS) de muestras procedentes de Electroforesis Bidimensional 					
Análisis bioinformático utilizando las bases de datos Mascot y PatternLab.					
Presentación de borrador de Tesis					
Aprobación de plan de Tesis por el asesor y co-asesor final					



CAPÍTULO III: RESULTADOS

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Se sabe que las muestras de este proyecto se han obtenido en la consulta privada, contando con la participación voluntaria de pacientes con gingivitis y pacientes con encía saludable. Se recolectó Líquido Gingival Crevicular de ambas poblaciones y posteriormente fue enviado para su análisis por medio de Electroforesis Bidimensional y Espectrometría de Masas. Usando estos métodos, analizaremos los posibles biomarcadores para la detección de gingivitis.

Se obtuvieron los datos para su análisis bioinformático.



1. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:

1.1 MAPA PROTEICO OBTENIDO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL, GEL 2D (SDS-PAGE):

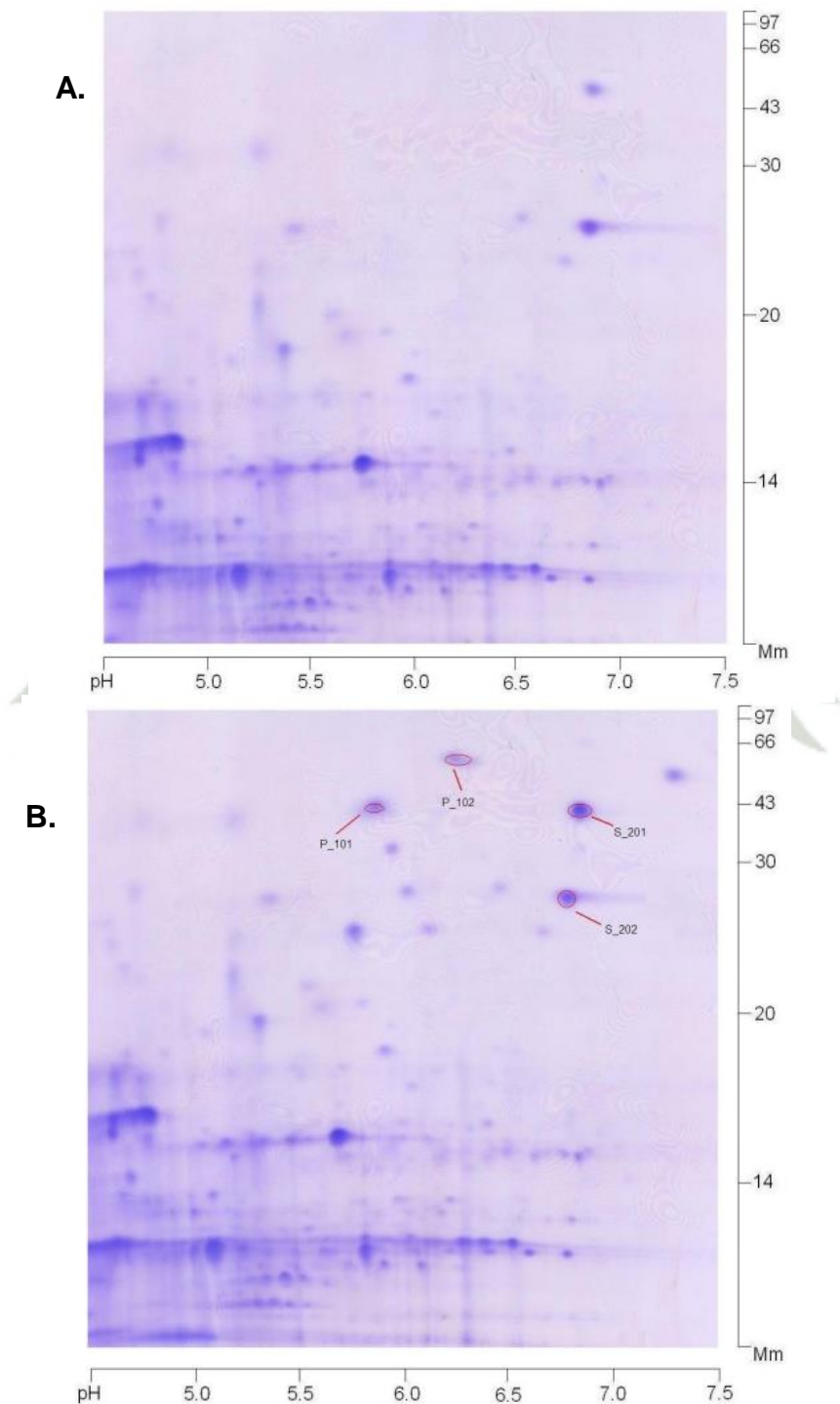


Ilustración 5. Gel de Electroforesis bidimensional de encía de paciente sano (A) y Encía de paciente con inflamación gingival (gingivitis) (B)

Gel 2D SDS-PAGE, gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas fueron extraídas con tinción de plata PlusOne tm (Amershan Bio-Sciences). Para su comparación fueron fotografiados con un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos) modelo ProXCISION. Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa PDQuest (Ilustración 5). Se realizó el recuento de spots proteicos usando el software PDQuest, se encontraron 42 spots en el mapa proteico del tejido saludable y 46 spots en el mapa proteico del tejido gingival inflamado (ANEXO 7). Se identificaron 4 spots de proteínas en un rango de pH de 6.0 a 7.0, a las cuales se les colocó los nombres de P101, P102, S201 y S202.



1.2 IDENTIFICACIÓN DE SPOTS PROTEICOS - SECUENCIAS “DENOVO” ESPECTROMETRÍA DE MASAS (ESI-MS/MS)

P_102	S_201
KPKNPANPVQRILGGH	DHSPVFLEKEMLLEIPENS
LDAKGSFPWQAKMVSHHNL	PVGAVFLLESAKDLVD
TTGATLINEQWLLTTAKNLFLN	KIRVNPDRKYPELVLDKAL
HSENATAKDIAPTLLTYVGGKQL	DYEERPELSFILTALDGGSPPRSGTA
QCKNYYKLRTEGD	LVRVVVDINDNSP
GVYTLNDKKQWINKAVGDKLPE	HASEDIRKTFEINQKSGD
CEADDGCPKPPEIAH	ITLTAPLDFEAIESYSIIIQATD
	GGGLFGKSTVRIQVMDV
	PETVVMVFRIRDRDSDNGKMVC
	SIPEDIPFVLKSSVN
P_101	S_202
VVIACLQGGFFPQ	GVPLYRHIADLAGNSEVILPV
EPLSVTWESEGGQVT	PAFNVIINGGSHAGNKLAM
ARNFPPSQDAS	QEFMILPVGAANFRE
GDLYTTSSQLTLPATQCLAG	AMRIGAEVYHNLKNVIKEYGKD
CHVKHYTNPSQDVTVPVPCPV	VGDEGGFAPNILENKEGL
PSTPPTSPSTPPTPSP	SPDQLADLYKSFIKDYPPV
TLKSGNTFRPEVHLLPPPS	SIEDPFDQDD
ALNELVTLTCLARGE	WGAWQKFTASAGIQVVGDD
AAEDWKKGDTF	LTVTNPKRIAKAVNEKSCNC
SCMVGHEALPLAFTQ	LLLKVNQIGSVTES
KTIDRLADWQMPPPY	

Figura 3. Secuencias “Denovo” obtenidas a través de Espectrometría de masas.

Se utilizó el sistema Xevo G2-XS QTOF. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: Sistema de fase líquida: ACQUITY UPCC; columna: Torus 2-PIC, 3,0 × 100 mm, 1,7 μm; fase móvil A: CO₂, fase móvil B: metanol acetonitrilo = 9:1; temperatura de la columna: 55°C, ABPR: 2600 psi; solución de compensación: solución de metanol con formiato de amonio 0,5 mM; velocidad de flujo: 0,5 ml/min; y volumen de inyección: 0,3 μL. El programa de gradiente se utilizó con un caudal de 1,0 ml/min y fue el siguiente: 0–2 min (1 % B), 2–7 min (1 %–5 % B), 7–10 min (5 % B), y 10-13 min (5%-1% B).

Xevo G2-XS QTOF aplicó la tecnología MS-E patentada para obtener la información espectral de masas primaria y secundaria de los compuestos para una

mayor confirmación estructural con una inyección al mismo tiempo. El modo ESI +/- se utilizó para el análisis de péptidos y aminoácidos (Figura 1).

1.3 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS (LAPS/OB)

1.3.1 Análisis de Secuencias Proteicas en el software DNASTAR y base de datos NCBI usando el software BLAST-p protein search.

Se procedió a editar las 4 secuencias proteicas primarias obtenidas por Espectrometría de Masas “DENOVO” usando la herramienta EditSeq del Software DNASTAR para obtener el correcto orden de la secuencia proteica y su masa (Ilustración 6, 7, 8 y 9).

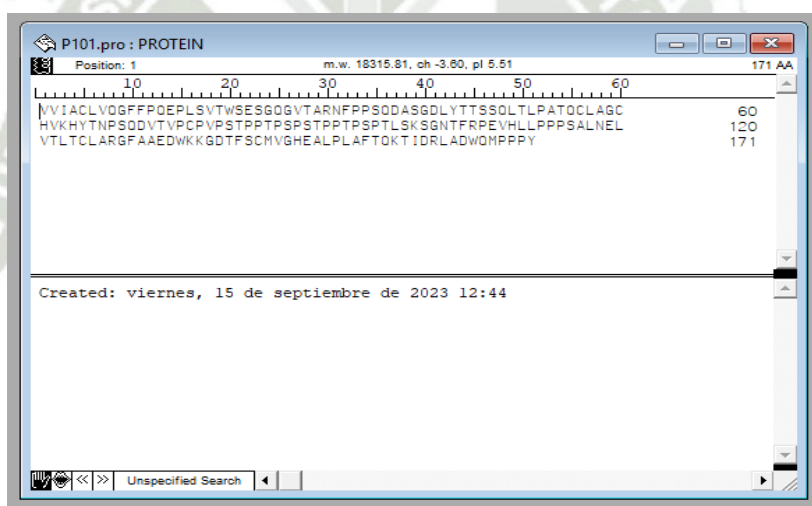


Ilustración 6. Edición de secuencia P101 en Software DNASTAR

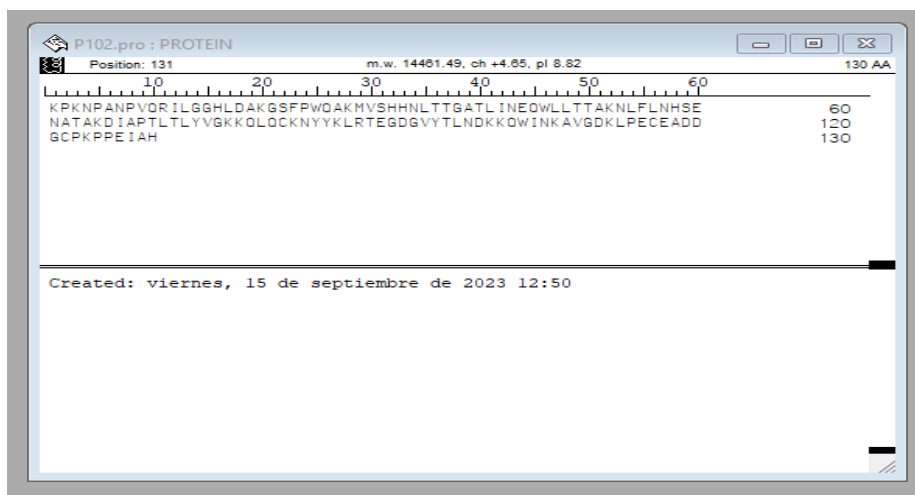


Ilustración 7. Edición de secuencia P102 en Software DNASTAR

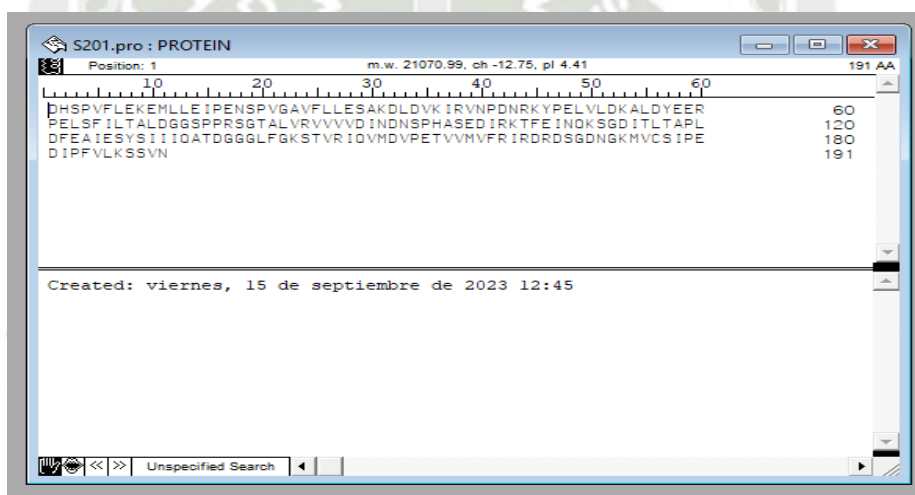


Ilustración 8. Edición de secuencia S201 en Software DNASTAR

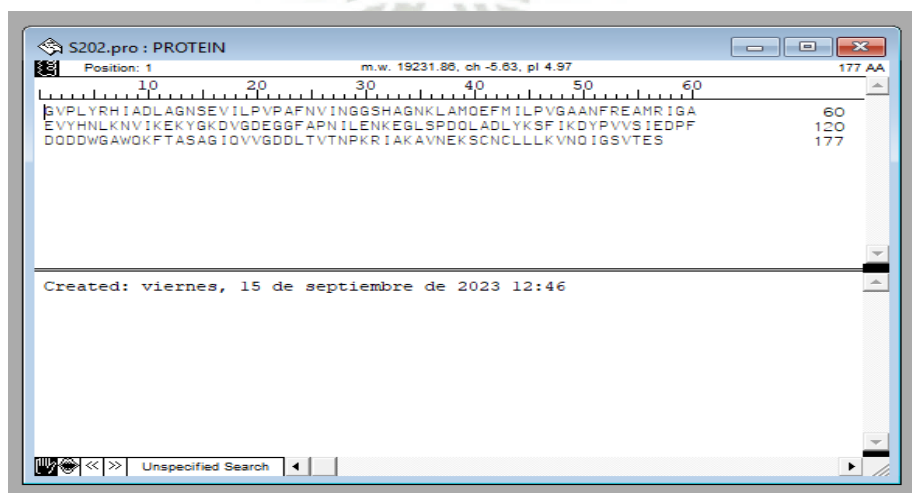


Ilustración 9. Edición de secuencia S202 en Software DNASTAR

En la **tabla 1** se muestran las cuatro secuencias proteicas editadas anteriormente en el software DNASTAR y sus respectivas masas. Estas secuencias serán utilizadas para su identificación proteica.

Cada secuencia de péptidos fue sometida a la base de datos del NCBI usando el programa BLAST-p protein search para una búsqueda específica de proteínas básicas a través del motor de búsqueda complementario Mascot. Para una correcta identificación de proteínas debemos tener en cuenta diversos factores como el número de péptidos a analizar, el grado de purificación de la proteína, y la calidad de la base de datos utilizada.

Las secuencias fueron identificadas como pertenecientes a las proteínas: región variable de Inmunoglobulina, haptoglobina, alfa enolasa y protocadherina beta 12 (**Tabla 2**).

Tabla 1. Masas y secuencias de péptidos obtenidos de los spots proteicos analizados por ESI-MS/MS

Spot	Secuencia	Masa péptida
P101	VVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQD ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPSTPPTPSPSTPPTPSPTLSKSGNTFRPEVHLLPPP SALNELVTLTCLARGFAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPL AFTQKTIDRLADWQMPPPY	18315.81
P102	KPKNPANPVQRILGGHLDAGSFPWQAKMVSHHNLTT GATLINEQWLLTTAKNLFLNHSENATAKDIAPTLTLYVG KKQLQCKNYYKLRTEGDGVYTLNDKKQWINKAVGDKL PECEADDGCPKPPEIAH	14461.49
S201	DHSPVFLEKEMLLEIPENSPVGAVFLLESADLDVKIRV NPDNRKYPELVLDKALDYEERPELSFILTALDGGSPPRS GTALVRVVVDINDNSPHASEDIRKTFEINQKSGDITLTA PLDFAIESYSIIIQATDGGGLFGKSTVRIQVMDVPETVV MVFRI RDRDSGDNGKMVCSIPEDIPFVLKSSVN	21070.99
S202	GVPLYRHIADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAM QEFMILPVGAANFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKD VGDEGGFAPNILENKEGLSPDQLADLYKSFIDYPVVS EDPFDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIA KAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTES	19231.86

Tabla 2. Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-p protein search.

N°	Nombre de proteína	Secuencia
1	EAW59195.1 haptoglobin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	MPHSTALPEARPTKMSALGAVIALLLWGQLFAVDSG NDVTDIADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKL RTEGDGVYTLNNEKQWINKAVGDKLPECEADDGCPK PPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRTEGDGEAMPCSL PHVNLRVRFTSPADVGKEGMLMMMSPSPRVYTLND KKQWINKAVGDKLPECEAVCGKPKNPANPVQRILGGH LDAKGSFPWQAKMVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAKN LFLNHSENATAKDIAPTLTLYVGKKQLVEIEKVVLHPNY SQVDIGLIKQKQKVSNERVMPICLPSKDYAEVGRVGY VSGWGRNANFKFTDHLKYVMLPVADQDQCIRHYEGS TVPEKKTSPKSPVGVQPILNEHTFCAGMSKYQEDTCYG DAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDKSCAVAEYGVYV KVTSIQDWVQKTIAEN
2	QRG33494.1 immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]	VRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMHWV RQATGKGLEWVSAIGSAGDTYYAGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCVRGRSSSSSYSYYGM DWWGQGTTVTVSSASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVI ACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVARNFPPSQDAS GDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDV TVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPS
3	AAB88178.1 alpha enolase, partial [Homo sapiens]	GTENKSKFGANAILGVSLAVCKAGAVEKGVPLYRHI ADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMI LPVGAANFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATN VGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDKVVIG MDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISPDQLADL YKSFIKDYVVSIEDPFDQDDWGAWQKFTASAGIQV

		VGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTE SLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVG LCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEELGSKAKFA GRNFRNPLAK
4	KAI4023123.1 protocadherin beta 12 [Homo sapiens]	MENGGAGTLQIRQVLLFFVLLGMSQAGSETGNFLVM EELQSGSFVGNLAKTLGLEVSELSSRGARVVSNDNK ECLQLDTNTGDLLLREMLDREELCGSNEPCVLYFQV LMKNPTQFLQIELQVRDINDHSPVFLEKEMLLEIPENS PVGAVFLLESAKDLVDGINAVKSYTINPNSHFHVKIRV NPDNRKYPELVLDKALDYEERPELSFILTALDGGSP RSGTALVRVVVDINDNSPEFEQAFYEVKILENSILGS LVVTVSAWDLDSGTNSELSYTFSHASEDIRKTFEINQ KSGDITLTAPLDFEAIESYSIIIQATDGGGLFGKSTVRI QVMDVNDNAPEITVSSITSPIPENTPETVVMVFRIRD RDSGDNGKMVCSIPEDIPFVLKSSVNNYYTLETERP LDRESRAEYNITITVTDLGTPLRKTEHNITVLVSDVND NAPFTQTSYALFVRENNSPALHIGSISATDRDSGTN AQVNYSLLPSQDPHLPLASLVSINADNGHLFALRSLD YEALQGFQFRVGATDHGSPALSSEALVRVLVLDAND NSPFVLYPLQNGSAPCTELVPWAAEPGYLVTKVAV DGDGQNAWLSYQLLKATEPGLFGVWAHNGEVRTA RLLSERDAAKHRLVVLVKDNGEPPRSATATLHVLLVD GFSQPYLPLPEAAPAQADSLTVYLVVALASVSSLF LFSVLLFVAVRLCRRSRAAPVGRCSVPEGPFGHLV DVSGTGTLQSQSYHYEVCVTGGSRSENEFKFLKPIIPNF LPQSTGSEVEENPPFQNNLGF

1.3.2 Estudio de Homología Secuencial en Software MegAlign (DNASTAR)

Para el estudio de Homología Secuencial, en la base de datos NCBI usando el programa BLAST-p protein search se buscaron 5 secuencias proteicas con mayor semejanza, para cada uno de los cuatro spots (P101, P102, S201*, S202), la búsqueda de cada secuencia demoró de 3 a 5 minutos, se descargó cada secuencia en formato FASTA (secuencia completa), se editaron en la herramienta EditSeq del software DNASTAR para su posterior análisis en conjunto con su respectivo spot, usando la herramienta MegAlign del mismo software.

Para la secuencia P101 se recolectaron 5 secuencias proteicas, todas pertenecientes a la proteína “región variable de Inmunoglobulina”, todas tienen un porcentaje de semejanza de identidad de 92.3% y un puntaje 190 y 191.

Para la secuencia P102 se recolectaron 5 secuencias proteicas, todas pertenecientes a la proteína “haptoglobina”, todas tienen un porcentaje de semejanza de identidad de entre el 48% al 62.9% y un puntaje entre 49.3 y 50.4.

*Para la secuencia S201 se recolectaron 2 secuencias proteicas, la cantidad estimada de secuencias a descargar para cada spot era 5, para el spot S201 solo se encontraron 2 secuencias en la base de datos, todas pertenecientes a la proteína “protocadherin beta 12”, ambas secuencias tienen un porcentaje de semejanza de identidad del 69.82% y un puntaje de 345.

Para la secuencia S202 se recolectaron 5 secuencias proteicas, pertenecientes a proteínas como “Proteína hipotética”, “alpha enolasa”, “C-myc promoter-binding protein 1”, “c-myc promoter-binding protein-1 isoform MBP-1” y “2-

phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase”, todas tienen un porcentaje de semejanza de identidad de 77.29% y un puntaje entre 342 y 343

Secuencias descargadas para spot P101:

QRG33494 - Immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 191, Identidad de 92.23%, E-Value de 4e-57

VRLVESGGGL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFSG	YDMHWVRQAT
GKGLEWVSAI	GSAGDTYYAG	SVKGRFTISR	ENAKNSLYLQ
MNSLRAGDTA	VYYCVRGRSS	SSSYSYYGMD	VWGQGTTVTV
SSASPTSPKV	FPLSLCSTQP	DGNVVIACLV	QGFFPQEPLS
VTWSESGQGV	TARNFPPSQD	ASGDLYTTSS	QLTLPATQCL
AGKSVTCHVK	HYTNPSQDVT	VPCPVPSTPP	TPSPSTPPTP SPS

QRG33768 - Immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 191, Identidad de 92.23%, E-Value de 6e-57

VQLVESGGGL	IQPGGSLRLS	CAASGFTVSS	NYMSWVRQAP
GKGLEWVSVI	YSGGSTYYAD	SVKGRFTISR	DNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTA	VYYCASSGAS	GSYQRGRGFY	YYYGMDVWGQ
GTTVTVSSAS	PTSPKVFPLS	LCSTQPDGNV	VIACLVQGFF
PQEPLSVTWS	ESGQGV TARN	FPPSQDASGD	LYTTSSQLTL
PATQCLAGKS	VTCHVKHYTN	PSQDVTVPCP	VPSTPPTPSP
STPPTPSPS			

QRG33592 - Immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 191, Identidad de 92.23%, E-Value de 6e-57

VQLVESGGGL	VKPGGSLRLS	CAASGFTFGT	YTMNWVRQAP
GKGLEWVSSI	SSRSETYYTD	SVKGRFTISR	DNAKNSLYLQ
VNSLRAEDTA	VYYCARVYYY	GAGSSYYYYY	YAMDVWGQGT
TVTSSASPT	SPKVFPLSLC	STQPDGNVVI	ACLVQGFFPQ
EPLSVTWSES	GQGV TARNFP	PSQDASGDLY	TTSSQLTLPA
TQCLAGKSVT	CHVKHYTNPS	QDVTVPCPVP	STPPTPSPST
			PPTPSPS

QRG33815 - Immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 190, Identidad de 92.23%, E-Value de 7e-57

VQLVQSGAEV	KKPGTSVKVS	CKASRGTFNS	NAISWVRQAA
GQGLEWMGGI	IPVSGTPNYA	QKFQGRVKVT	ADKSTSTVYM
EMSSLESED	AVYYCASHPR	LSGVTYYNYA	MDVWGQGTTV
TVSSASPTSP	KVFPLSLCST	QPDGNVVIAC	LVQGFFPQEP
LSVTWSESGQ	GVTARNFPPS	QDASGDLYTT	SSQLTLPATQ
CLAGKSVTCH	VKHYTNPSQD	VTVPCPVPST	PPTPSPSTPP
			TPSPS

QRG33534 - Immunoglobulin variable region, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 191, Identidad de 92.23%, E-Value de 6e-57

VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
GKGLEWVAGI IGSGGGTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLSL
QMNSLRAEDT AVYFCAKVRI MVRGGRGSDY WGQGTLVTVS
SASPTSPKVF PLSLCSTQPD GNVVIACLVQ GFFPQEPLSV
TWSESGQGV TARNFPSPQDA SGDLYTTSSQ LTLPATQCLA
GKSVTCHVKH YTNPSQDVTV PCPVPSTPPT PSPSTPPTPS PS

Secuencias descargadas para spot P102:

BDU79556 - Haptoglobin, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 50.4, Identidad de 62.69%, E-Value de 6e-05

CGKPKNPANP VQRILGGHLD AKGSFPWQAK MVSHHNLTTG
ATLINEQWLL TTAKNLFLNH SENATAKDIA PTLTLYVGKK QLVEIEKVVL
HPNYSQVDIG LIKLIKQK

KAI2579624 - Haptoglobin [Homo sapiens]

Puntuación de 50.4, Identidad de 48%, E-Value de 3e-04

MSRISQMTAA RSPRLHMAM WSTRFATSVR TNPVQRILGG
HLDAKGSFPW QAKMVSHHNL TTGATLINEQ WLLTTAKNLF
LNHSENATAK DIAPTLTLYV GKKQLVEIEK VVLHPNYSQV DIGLIKLIKQK
VSVNERVMPI CLPSKDYAEV GRVGYVSGWG RNANFKFTDH
LKYVMLPVAD QDQCIRHYEG STVPEKKTTPK SPVGVQPILN
EHTFCAGMSK YQEDTCYGDA GSAFAVHDLE EDTWYATGIL
SFDKSCAVAE YGVYVKVTSI QDWVQKTIAE N

AAH70299 - HP protein [Homo sapiens]

Puntuación de 50.4, Identidad de 48%, E-Value de 3e-04

MSRISQMTAA RSPRLHMAM WSTRFATSVR TNAVQRILGG
 HLDKGSFPW QAKMVSHHNL TTGATLINEQ WLLTTAKNLF
 LNHSNATAK DIAPTLTLYV GKKQLVEIEK VVLHPNYSQV DIGLIKLKQK
 VSVNERVMPI CLPSKDYAEV GRVGYVSGWG RNANFKFTDH
 LKYVMLPVAD QDQCIRHYEG STVPEKKTTPK SPVGVQPILN
 EHTFCAGMSK YQEDTCYGDA GSAFAVHDLE EDTWYATGIL
 SFDKSCAVAE YGVYVKVTSI QDWVQKTIAE N

KAI2579628 - Haptoglobin-related protein [Homo sapiens]

Puntuación de 49.3, Identidad de 62.9%, E-Value de 0.001

MSRIFQMTAS RSPLRLQMAM WSTCFATSVR TNPVQRILGG
 HLDKGSFPW QAKMVSHHNL TTGATLINEQ WLLTTAKNLF
 LNHSNATAK DIAPTLTLYV GKKQLVEIEK VVLHPNYHQV
 DIGLIKLKQK VLVNERVMPI CLPSKNYAEV GRVGYVSGWG
 QSDNFKLTDH LKYVMLPVAD QYDCITHYEG STCPKWKAPK
 SPVGVQPILN EHTFCVGMMSK YQEDTCYGDA GSAFAVHDLE
 EDTWYAAGIL SFDKSCAVAE YGVYVKVTSI QDWVQKTIAE N

4X0L_C - Chain C, Haptoglobin [Homo sapiens]

Puntuación de 49.3, Identidad de 62.9%, E-Value de 0.001

VCGKPKNPAN PVQRILGGHL DAKGSFPWQA KMVSHHNLTT
 GATLINEQWL LTTAKNLFLN HSENATAKDI APTLTLYVGK
 KQLVEIEKVV LHPNYSQVDI GLIKLKQKVS VNERVMPICL
 PSKDYAEVGR VGYVSGWGRN ANFKFTDHLK YVMLPVADQD
 QCIRHYEGST VPEKKTTPKSP VGVQPILNEH TFCAGMSKYQ
 EDTCYGDAGS AFAVHDLEED TWYATGILSF DKSCAVAEYG
 VYVKVTSIQD WVQKTIAEN

Secuencias descargadas para spot S201:

KAI4023123

- Protocadherin beta 12 [Homo sapiens]

Puntuación de 345, Identidad de 69.82%, E-Value de 1e-110

MENGGAGTLQ	IRQVLLFFVL	LGMSQAGSET	GNFLVMEELQ
SGSFVGNLAK	TLGLEVSELS	SRGARVVSND	NKECLQLDTN
TGDLLLREML	DREELCGSNE	PCVLYFQVLM	KNPTQFLQIE
LQVRDINDHS	PVFLEKEMLL	EIPENSPVGA	VFLLES AKDL
DVGINAVKSY	TINPNSHFHV	KIRVNP DNRK	YPELVLDKAL
DYEERPELSF	ILTALDGGSP	PRSGTALVRV	VVDINDNSP
EFEQAFYEVK	ILENSILGSL	VVTVSAWDL D	SGTNS ELSYT
FSHASEDIRK	TFEINQKSGD	ITLTAPLDFE	AIESYSIIIQ
ATDGGGFLFGK			
STVRIQVMDV	NDNAPEITVS	SITSPIPENT	PETVVMVFRI
RDRDSGDNGK	MVCSIPEDIP	FVLKSSVNNY	YTLETERPLD
RESRAEYNIT	ITVTDLGTPR	LKTEHNITVL	VSDVNDNAPA
FTQTSYALFV	RENNSPALHI	GSISATDRDS	GTNAQVNYSL
LPSQDPHLPL	ASLV SINADN	GHLFALRSLD	YEALQGFQFR
VGATDHGSPA	LSSEALVRVL	VLDANDNSPF	VLYPLQNGSA
PCTELVPWAA	EPGYLVTKVV	AVDGD SGQNA	WLSYQLLKAT
EPGLFGVWAH	NGEVRTARLL	SERDAAKHRL	VVLVKDNGEP
PRSATATLHV	LLVDGFSQPY	LPLPEAAPAQ	AQADSLTVYL
VVALASVSSL	FLFSVLLFVA	VRLCRRSRAA	PVGRCSVPEG
PFPGHLVDVS	GTGTLSQSYH	YEVCVTGGSR	SNEFKFLKPI
IPNFLPQSTG	SEVEENPPFQ	NNLGF	



NP 061755

- Protocadherin beta-12 precursor [Homo sapiens]

Puntuación de 345, Identidad de 69.82%, E-Value de 1e-110

MENGGAGTLQ	IRQVLLFFVL	LGMSQAGSET	GNFLVMEELQ
SGSFVGNLAK	TLGLEVSELS	SRGARVVSND	NKECLQLDTN
TGDLLLREML	DREELCGSNE	PCVLYFQVLM	KNPTQFLQIE
LQVRDINDHS	PVFLEKEMLL	EIPENSPVGA	VFLLESADKL
DVGINAVKSY	TINPNSHFHV	KIRVNPDRK	YPELVLDKAL
DYEERPELSF	ILTALDGGSP	PRSGTALVRV	VVVDINDNSP
EFEQAFYEVK	ILENSILGSL	VVTVSAWDL	SGTNSSELSYT
FSHASEDIRK	TFEINQKSGD	ITLTAPLDFE	AIESYSIIIQ
ATDGGGLFGK	STVRIQVMDV	NDNAPEITVS	SITSPIPENT
PETVVMVFRI	RDRDSGDNGK	MVCSIPEDIP	FVLKSSVNNY
YTLETERPLD	RESRAEYNIT	ITVTDLGTPR	LKTEHNITVL
VSDVNDNAPA	FTQTSYALFV	RENNSPALHI	GSISATDRDS
GTNAQVNYSL	LPSQDPHLPL	ASLVSINADN	GHLFALRSLD
YEALQGFQFR	VGATDHGSPA	LSSEALVRVL	VLDANDNSPF
VLYPLQNGSA	PCTELVPWAA	EPGYLVTKVV	AVDGDGQNA
WLSYQLLKAT	EPGLFGVAH	NGEVRTARLL	SERDAAKHRL
VVLVKDNGEP	PRSATATLHV	LLVDGFSQPY	LPLPEAAPAQ
AQADSLTVYL	VVALASVSSL	FLFSVLLFVA	VRLCRRSRAA
PVGRCSVPEG	PFPGHLVDVS	GTGTLQSQSYH	YEVCVTGGSR
SNKFKFLKPI	IPNFLPQSTG	SEVEENPPFQ	NNLGF

Secuencias descargadas para spot S202:

CAH56247

- Hypothetical protein, partial [Homo sapiens]

GVS KAVEHIN	KTIAPALVSK	KLNVTEQEKI	DKLMIEMDGT
ENKSKFGANA	ILGVSLAVCK	AGAVEKGVPL	YRHIADLAGN
SEVILPVPFAF	NVINGGSHAG	NKLAMQEFMI	LPVGAANFRE
AMRIGAEVYH	NLKNVIKEKY	GKDATNVGDE	GGFAPNILEN
KEGLELLKTA	IGKAGYTDKV	VIGMDVAASE	FFRSGKYDLD
FKSPDDPSRY	ISPDQLADLY	KSFIKDYPVV	SIEDPFDQDD
WGAWQKFTAS	AGIQVVGDDL	TVTNPKRIAK	AVNEKSCNCL
LLKVNQIGSV	TESLQACKLA	QANGWGMVS	HRSGETEDTF
IADLVVGLCT	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	LRIEEELGSK
AKFAGRNFN	PLAK		

Puntuación de 343, Identidad de 77.29%, E-Value de 3e-115

AAB88178 - Alpha enolase, partial [Homo sapiens]

Puntuación de 342, Identidad de 77.29%, E-Value de 3e-115

GTENKSKFGA	NAILGVSLAV	CKAGAVEKGV	PLYRHIADLA
GNSEVILPVP	AFNVINGGSH	AGNKLAMQEF	MILPVGAANF
REAMRIGAEV	YHNLKNVIKE	KYGKDATNVG	DEGGFAPNIL
ENKEGLELLK	TAIGKAGYTD	KVVIGMDVAA	SEFFRSGKYD
LDFKSPDDPS	RYISPDQLAD	LYKSFIDYD	VVSIEDPFDQ
DDWGAWQKFT	ASAGIQVVD	DLTVTNPRI	AKAVNEKSCN
CLLLKVNQIG	SVTESLQACK	LAQANGWVM	VSHRSGETED
TFIADLVVGL	CTGQIKTGAP	CRSERLAKYN	QLLRIEEEELG
SKAKFAGRNF	RNPLAK		

ADK47995 - C-myc promoter-binding protein 1 [Homo sapiens]

Puntuación de 343, Identidad de 77.29%, E-Value de 4e-115

MDGTENKSKF	GANAILGVSL	AVCKAGAVEK	GVPLYRHIAD
LAGNSEVILP	VPAFNVINGG	SHAGNKLAMQ	EFMILPVGAA
NFREAMRIGA	EVYHNLKNVI	KEYGKDATN	VGDEGGFAPN
IENKEGLEL	LKTAIGKAGY	TDKVVIGMDV	AASEFFRSGK
YDLDFKSPDD	PSRYISPDQL	ADLYKSFID	YPVVSIEDPF
DQDDWGAWQK	FTASAGIQVV	GDDLTVTNP	RIAKAVNEKS
CNCLLLKVNQ	IGSVTESLQA	CKLAQANGWG	VMVSHRSGET
EDTFIADLVV	GLCTGQIKTG	APCRSERLAK	YNQLLRIEEE
LGSKAKFAGR	NFRNPLAK		

- c-myc promoter-binding protein-1 isoform MBP-1

NP_001188412

[Homo sapiens]

Puntuación de 343, Identidad de 77.29%, E-Value de 5e-115

MIEMDGTENK	SKFGANAILG	VSLAVCKAGA	VEKGVPLYRH
IADLAGNSEV	ILPVPAFNV	NGGSHAGNKL	AMQEFMILPV
GAANFREAMR	IGAEVYHNLK	NVIKEYGKD	ATNVGDEGGF
APNILENKEG	LELLKTAIGK	AGYTDKVVIG	MDVAASEFFR
SGKYDLDFKS	PDDPSRYISP	DQLADLYKSF	IKDYPVVSIE
DPFDQDDWGA	WQKFTASAGI	QVVGDDLTVT	NPKRIAKAVN
EKSCNCLLLK	VNQIGSVTES	LQACKLAQAN	GWGVMVSHRS
GETEDTFIAD	LVVGLCTGQI	KTGAPCRSER	LAKYNQLLRI
EEELGSKAKF	AGRNFRNPLA	K	

CAA59331

- 2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase [Homo sapiens]

Puntuación de 344, Identidad de 77.29%, E-Value de 9e-115

MSILKIHARE	IFDSRGNPTV	EVDLFTSKGL	FRAAVPSGA	STGIYEAL
RDNDKTRYMG	KGVS KAVEHI	NKTIAPALVS	KKLVNTEQEK	
IDKLMIEDMG	TENKSKFGAN	AILGVSLAVC	KAGAVEKGVP	
LYRHIADLAG	NSEVILPVPA	FNVINGGSHA	GNKLAMQEFM	
ILPVGAANFR	EAMRIGAEVY	HNLKNVIKEK	YGKDATNVGD	
EGGFAPNILE	NKEGLELLKT	AIGKAGYTDK	VVIGMDVAAS	
EF SRSGKYDL	DFKSPDDPSR	YISPDQLADL	YKSF IKDYPV	
VSIEDPFDQD	DWGAWQKFTA	SAGIQVVGDD	LTVTNPKRIA	
KAVNEKSCNC	LLLKVNQIGS	VTESLQACKL	AQANGWGMV	

Después de descargar las 5 proteínas seleccionadas por spot, se eligieron las 3 primeras que presentan mayor porcentaje de identidad para realizar el alineamiento de secuencias usando la herramienta MegAlign del software DNASTAR. Para el análisis de homología, se insertó la secuencia del spot y 3 secuencias descargadas del programa BLAST-p protein search, se usó la alineación tipo ClustalW, se ajustaron las opciones del alineamiento para que este sea en base al spot.

P101:

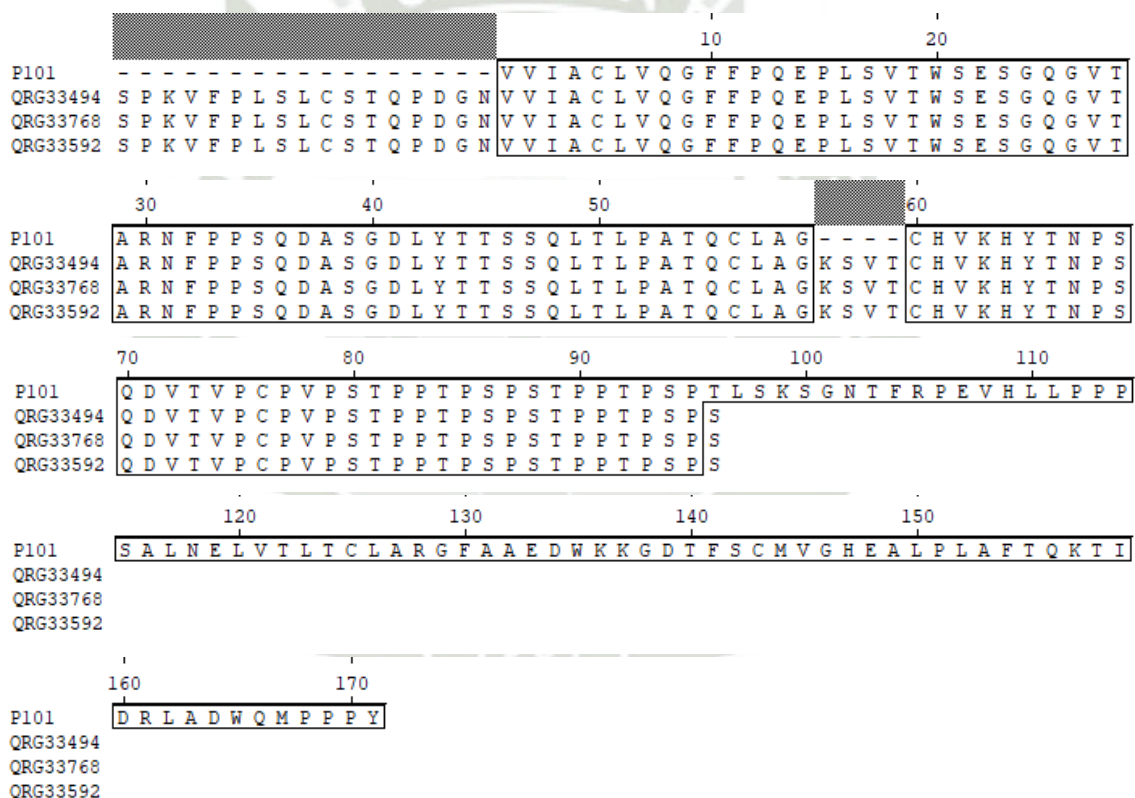


Figura 4. Estudio comparativo de homología secuencial de spot P101

S201:

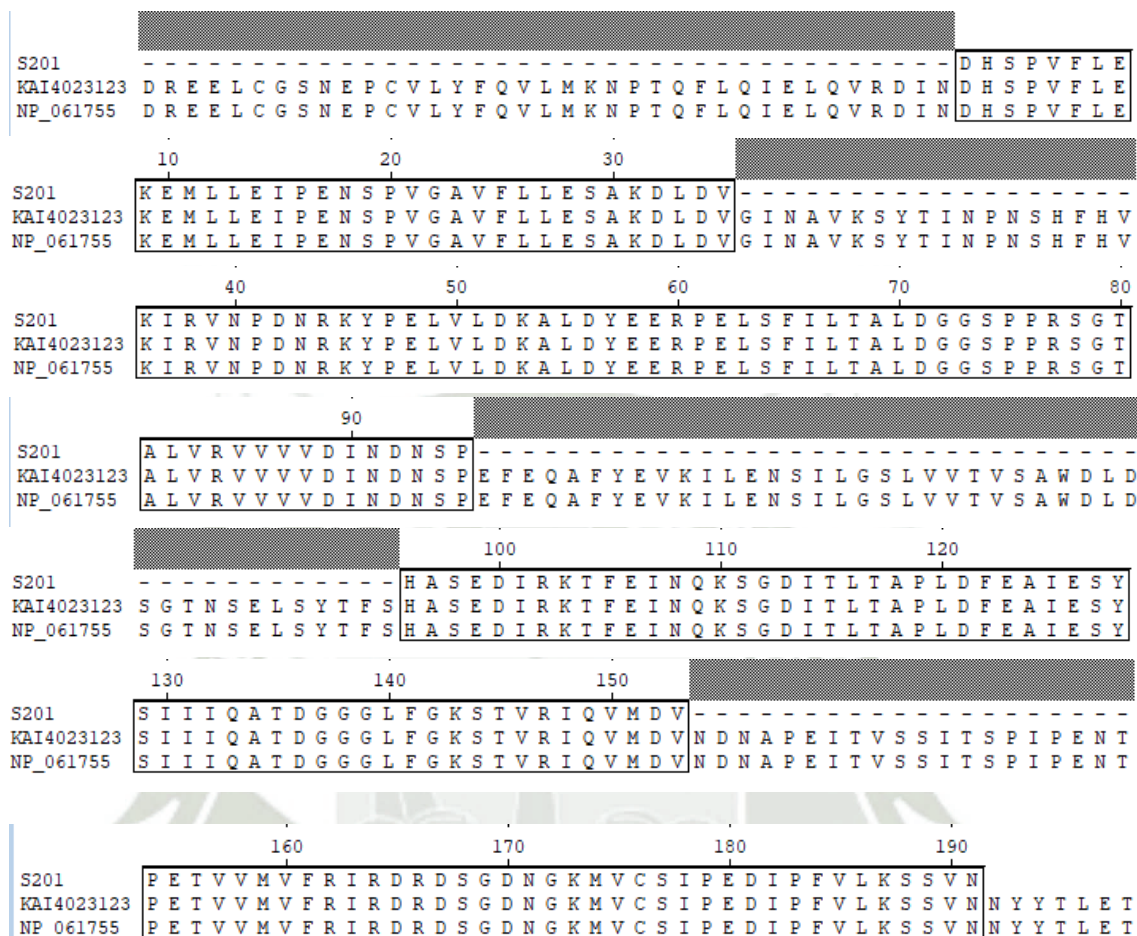


Figura 6. Estudio comparativo de homología secuencial de proteína S201

TABLA 3. Proteínas a las que pertenecen los péptidos analizados:

SPOT	Número de acceso	de Nombre proteína	de Función
P101	QRG33494	Región variable de Inmunoglobulina	Respuesta inmunitaria, unión al antígeno específico, secuencia variable.
P102	BDU79556	Haptoglobina	neutralización del daño oxidativo, aparición durante la fase aguda de inflamación.
S201	KAI4023123	Protocadherina beta 12	Determinación de conexiones sinápticas, adhesión celular.
S202	AAB88178	Alfa enolasa	Tiene función en la actividad de la plasmina, en la superficie celular. Degradación del tejido circundante de la célula.

2. DISCUSIÓN

La gingivitis es la segunda enfermedad más común en la cavidad bucal, afecta al 90% de la población. Es un proceso inflamatorio agudo que produce sangrado al sondaje, se observa irritación, inflamación y enrojecimiento de encía libre e interproximal. (2) Su aparición se debe a malos hábitos de higiene bucal, fumar, deficiencia de vitamina C, malposición dentaria, enfermedades sistémicas como la leucemia, VIH/SIDA, diabetes, tratamiento oncológico, medicamentos como la fenitoína, bloqueadores de los canales de calcio y cambios hormonales (1).

El diagnóstico de esta enfermedad es realizado por el odontólogo, a través de la evaluación clínica e historial médico del paciente. El uso de nueva tecnología puede ser útil para encontrar una forma de detección temprana de gingivitis, como la proteómica, ciencia que nos ayuda a encontrar proteínas implicadas en la enfermedad, pudiendo ser utilizadas posteriormente como biomarcadores en la detección temprana de esta enfermedad. En este trabajo se realizó un estudio piloto, analizando las proteínas diferenciales encontradas en muestras de Líquido Gingival Crevicular de 5 pacientes con tejido gingival saludable y 5 pacientes con gingivitis, usando Electroforesis Bidimensional y Espectrometría de Masas.

Se encontraron 4 biomarcadores moleculares, “Región Variable de Inmunoglobulina”, “Haptoglobina”, “Protocadherina beta 12” y “Alfa Enolasa”

Schroeder et al. mencionan que las Inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas, es decir, formada por componentes diferentes, pero estrechamente relacionados. Están compuestas por 2 cadenas pesadas y 2 ligeras.

Se separan funcionalmente en regiones variables que se unen a antígenos y dominios constantes que especifican funciones efectoras (25).

Respecto a su papel en la inflamación, Vletter et al. mencionan que las inmunoglobulinas tienen la capacidad para desarrollar efectos inflamatorios en todo el organismo, dependiendo, por ejemplo, del isotipo utilizado o las propiedades de la cola del Fragmento cristalizable (Fc) (26).

Tang et al. realizaron un estudio en el cual analizaron saliva, suero y Líquido Gingival Crevicular en 17 pacientes con periodontitis crónica, 17 pacientes con gingivitis y 16 pacientes periodónticamente saludables por medio de espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). En sus resultados describen la presencia de “Inmunoglobulin kappa variable 4-1”, proteína involucrada en el reconocimiento de antígeno, la cual se expresó a nivel de la saliva en pacientes con gingivitis y periodontitis, en este último grupo se expresó en menor concentración en suero, los autores mencionan que no hay estudios que reporten la aparición de esta proteína, pero la aparición de Inmunoglobulina Kappa variable 4-1 en saliva, exhibiría la defensa del cuerpo ante los antígenos, y la presencia en suero sería indicador de la presencia de enfermedades subyacentes cuya expresión se da en el suero (27).

Andrianus et al. midió los niveles de Inmunoglobulina G en fluido gingival crevicular de un grupo de mujeres menopáusicas y mujeres sin menopausia en Indonesia. El resultado del estudio indicó que los niveles de IgG en el grupo con menopausia fueron más bajos que los del grupo sin menopausia (28).

La inmunoglobulina G (IgG) es parte del sistema inmunológico que protege el tejido periodontal de patógenos y se puede encontrar en el líquido crevicular gingival (GCF). La disminución de los niveles de inmunoglobulinas, especialmente IgG, aumentará la progresión de la enfermedad periodontal. El estrógeno regula la glicosilación de la IgG, que es necesaria para que la IgG funcione como agente antiinflamatorio. La disminución de los niveles de estrógeno da como resultado la supresión del efecto antiinflamatorio de la IgG, aumentando así el riesgo de progresión de la enfermedad periodontal (28).

Yuan et al. realizaron un estudio que compara los perfiles peptídicos de saliva, suero y líquido gingival crevicular en pacientes con periodontitis generalizada (estadio I y II) antes y después de su tratamiento, a través de MALDI-TOF MS. Participaron 17 pacientes. En los resultados obtenidos después del tratamiento de la periodontitis generalizada, se observó una disminución en la presencia de proteínas, entre ellas la “constante pesada de Inmunoglobulina $\gamma 2$ ”, los autores sugieren que la disminución sugiere cambios en la respuesta inmunológica del huésped (29).

En los resultados de nuestro estudio, encontramos “Región variable de Inmunoglobulina” la cual podemos interpretar como Inmunoglobulina. Su presencia en la gingivitis puede significar una respuesta de defensa ante la inflamación del tejido gingival, para tratar de frenar el progreso de la enfermedad gingival.

Theilgaard-Monch describe a la haptoglobina como una proteína que se hace presente durante la fase aguda de la inflamación. Su concentración aumenta en caso de estímulo inflamatorio. La aparición de esta proteína es inducida por la IL-

6, producida por citoquinas primarias como TNF e IL-1. La haptoglobina ejerce actividades antiinflamatorias y podría actuar indirectamente como agente antioxidante y bacteriostático. Entre sus funciones mencionamos la unión a hemoglobina para su posterior eliminación por macrófagos, reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, extinción de radicales libres, reparación y regeneración de tejidos. Su papel en la inflamación es reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) gracias a su función antioxidante (30).

Mencionamos anteriormente el estudio de Tang et al. quienes realizaron un estudio en el cual analizaron saliva, serum y Líquido Gingival Crevicular (GCF) en 17 pacientes con periodontitis crónica, 17 pacientes con gingivitis y 16 pacientes periodónticamente saludables por medio de espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). En los resultados, se encontró una mayor concentración de Haptoglobina en las muestras de saliva, serum y GCF de pacientes con Gingivitis y Periodontitis. Los autores sugieren que, al ser una proteína de fase aguda, el aumento notable de niveles de Haptoglobina refleja su función antiinflamatoria, su presencia puede indicar la recuperación de la homeostasis tisular, al mismo tiempo podría tener relación con la reconstrucción del periodonto (27).

Mencionamos nuevamente el estudio de Yuan et al., quienes realizaron un estudio que comparativo de los perfiles peptídicos de saliva, suero y líquido gingival crevicular en pacientes con periodontitis generalizada (estadio I y II) antes y después de su tratamiento, a través de MALDI-TOF MS. Participaron 17 pacientes. Comparando los resultados obtenidos antes y después del tratamiento de

periodontitis generalizada, se observó una disminución en la presencia de proteínas, entre ellas la haptoglobina, los autores sugieren que puede reflejar la disminución del proceso inflamatorio y el inicio de reparación del tejido periodontal (29).

En nuestro estudio, encontramos la presencia de “Haptoglobina”, al ser una proteína de fase aguda, su presencia en la inflamación gingival podría indicar neutralización del daño oxidativo, con la finalidad de detener el daño provocado por la inflamación.

Hableib et al. nos describen a las Protocadherinas como proteínas transmembranales tipo 1, compuestas por más de 50 genes y que su estudio aún está en desarrollo. Se codifican por 3 tipos de clústers, alfa, beta y gamma. Tienen similitud con las Inmunoglobulinas. Dentro de sus funciones incluyen la interacción célula-célula en el desarrollo neuronal, la expresión en regiones del Sistema Nervioso Central de vertebrados y la adhesión celular (31). Sano et al. mencionan que las protocadherinas se expresan tanto en tejido neuronal como no neuronal (32). Se ha encontrado protocadherina en estudios relacionados a carcinoma de células escamosas de esófago, Ning et al. descubrieron funciones antitumorales en la Protocadherina 20 (33).

Feldheim et al. evaluaron la protocadherina gama C3 en tejido cerebral no canceroso y en gliomas de diferentes grados, dando como resultado una mayor expresión de protocadherina gama C3 en el tejido canceroso (34).

Esta es la primera vez en la que se detecta “Protocadherina beta 12” en líquido gingival crevicular. Los autores mencionados anteriormente, mencionan entre sus

funciones a la adhesión celular, entonces su expresión en líquido gingival crevicular de tejido gingival inflamado podría indicar adhesión celular, relacionada a hiperplasia.

Pancholi describe a la “alfa enolasa” (ENO1) es una proteína multifuncional, tiene capacidad para servir como receptor de plasminógeno en la superficie de células hematopoyéticas, epiteliales y endoteliales, puede desempeñar un papel importante en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular. En los últimos años se ha reconocido su papel en trastornos autoinmunes sistémicos. Pertenece a la familia de las enolasas y está presente en casi todos los tejidos adultos. Actúa como mediador en la degradación de plasmina y matriz extracelular, y participa en la respuesta inmune (35). Capello ha estudiado su uso como biomarcador en detección de cáncer y tumores cerebrales (36). Se ha descrito la presencia de “alfa enolasa” en enfermedades como lupus eritematoso sistémico, en el estudio de Chapman et al., como anticuerpos asociados con afectación de la piel y los riñones (37).

Davis et al. realizaron un análisis proteómico de Líquido Gingival Crevicular por cuantificación longitudinal en Caninos durante la progresión de gingivitis a periodontitis. Se extrajo Líquido Gingival Crevicular de 8 canes con distintos estadios de gingivitis y periodontitis y se analizó por espectrometría de masas. En los resultados, muestran una lista extensa de proteínas encontradas, entre ellas, encontramos a Alfa Enolasa, siendo expresada en gingivitis y periodontitis, observamos un mayor nivel de expresión en periodontitis. (38).

Yaprak et al. realizaron un estudio en el cual se analizó tejido gingival saludable por medio de electroforesis bidimensional, digestión trípica in-gel y Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI-TOF), para obtener proteínas que se expresan en tejido gingival saludable. Entre las proteínas encontradas, mencionan a “alfa enolasa”. Los autores mencionan que su estudio establece un mapa proteómico inicial del tejido gingival de individuos sanos (22).

Bellei et al., realizaron una búsqueda de biomarcadores en pacientes con periodontitis grave, analizando el Líquido Gingival Crevicular usando proteómica. Las muestras se obtuvieron de sitios periodontalmente sanos y bolsas periodontales, posteriormente se realizó un análisis comparativo utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDSPAGE). Se identificaron un total de 26 proteínas significativamente diferentes, siendo 14 proteínas de “regulación positiva” y 12 de “regulación negativa”, una de las proteínas encontradas en el grupo de proteínas de “regulación negativa” fue alfa enolasa (ENO1), a la cual describen como una enzima glicolítica implicada en el control del crecimiento tisular y la tolerancia a la hipoxia (39).

No es la primera vez que se encuentra “alfa enolasa” en Líquido Gingival Crevicular, pero sí es la primera vez que se encuentra presente en gingivitis en humanos. La expresión de “alfa enolasa” en gingivitis podría relacionarse a la regulación de células responsables de la respuesta inmunitaria, al mismo tiempo, durante la gingivitis observamos aumento de tejido gingival, a esto se puede relacionar la función reguladora del crecimiento de tejido.

3. CONCLUSIONES:

-Por medio del análisis por electroforesis bidimensional, se encontraron 42 spots proteicos en tejido gingival saludable.

-Por medio del análisis por electroforesis bidimensional, se encontró expresión proteómica en tejido gingival inflamado, encontrando 46 spots proteicos.

-A nivel diferencial, se encontraron 4 spots proteicos expresados en todas las muestras de tejido gingival inflamado, los cuales fueron identificados por medio de espectrometría de masas y análisis bioinformático. Bajo los límites de este estudio, se ha podido confirmar la presencia de 4 biomarcadores moleculares presentes en gingivitis y ausentes en tejido saludable, siendo los siguientes: “región variable de inmunoglobulina”, “haptoglobina”, “protocadherina beta 12” y “alfa enolasa”.

4. RECOMENDACIONES:

-En futuras investigaciones, realizar la búsqueda de las proteínas mencionadas en este estudio, pero en una población mayor.

-Continuar con el estudio de cada proteína encontrada, especialmente de la "Protocadherina beta 12" cuyo estudio en comparación con las demás, es muy limitado.

-Impulsar el estudio de biomarcadores en la enfermedad gingival, ya que es un tema de investigación que no tiene antecedentes nacionales, siendo esta la segunda enfermedad más común en boca.

-Impulsar el uso de Espectrometría de Masas y Electroforesis Bidimensional en la Universidad, por medio de cursos y capacitaciones.

REFERENCIAS:

1. Gingivitis [Internet]. MayoClinic.org. 2017. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/gingivitis/symptoms-causes/syc-20354453>
2. Bostanci N, Bao K. Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation. proteomics [Internet]. 2017;17(3–4):1–35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27995754/>
3. Test diagnóstico de Gingivitis (Detección de Bacterias Gingivales pre-Implante) [Internet]. LAB DURAN BELLIDO. 2016. Disponible en: <https://laboratoriodeanalisiscnicos.com/analisis-clinicos-medicina-personalizada/test-diagnostico-gingivitis-deteccion-bacterias-gingivales-pre-implante>
4. Worsfold P, Alan T, Poole C. ELECTROPHORESIS | Nucleic Acids. En: Elsevier, editor. Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition) [Internet]. 2005. p. 456–60. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977001308>
5. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. Metallomics [Internet]. 2014;6(5):1068--1078. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00033a>
6. Brunelle, J. L., & Green, R. Chapter Twelve. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). En: Lorsch J, editor. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)

- [Internet]. Academic Press; 2014. p. 151–9. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00012-4>
7. Saraswathy N, Ramalingam P. Introduction to proteomics. En: Saraswathy N, Ramalingam P, editores. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics [Internet]. Nueva Delhi, India: Woodhead Publishing; 2011. p. 147--158. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568107500109>
 8. Creative proteomics blog [Internet]. Creative Proteomics Blog. Disponible en:
<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/two-dimensional-gel-electrophoresis-2-de/>
 9. Dunn, M. J., & Patel, K. Two-Dimensional Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients in the First Dimension. Methods in molecular biology. 1988; 3:203--216.
 10. Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y. et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. Clin Proteom [Internet]. 2014;11(16):1–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-11-16>
 11. Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. The Clinical Bio. 2003;24(1):3–12.
 12. Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. The Clinical Bio. 2003;24(1):3–12.

13. Queroa S, Párraga-Nino N, García-Núñez M, Sabrià M. Proteómica en enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2016;34(4):253–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.07.015>
14. Calderón Vélez Juan Camilo. PROTEÍNAS: REDEFINIENDO ALGUNOS CONCEPTOS. *rev.fac.med.* [Internet]. 2006 June ; 54(2):143-147. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200010&lng=en.
15. Persson GR, DeRouen TA, Page RC. Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* [Internet]. 1990;25(2):81–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2139121/>
16. Oringer RJ, Howell TH, Nevins ML, Reasner DS, Davis GH, Sekler J, et al. Relationship between crevicular aspartate aminotransferase levels and periodontal disease progression. *J Periodontol* [Internet]. 2001 ;72(1):17–24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11210069/>
17. Palys MD, Haffajee AD, Socransky SS, Giannobile WV. Relationship between C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and putative periodontal pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1998 ;25(11):865–71. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9846794/>
18. Casillas APV, Ocampo BRY. Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias 2018. Primera parte. *Rev Odontol Mex*

- [Internet]. 2022 ;25(1):10–26. Disponible en:
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=104194>
19. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol* 2000 [Internet]. 2016;70(1):53–64. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662482/>
20. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, Guzman YA, Garcia BA, Floudas CA. Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2013;40(2):131–9. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23190455/>
21. Bostanci N, et al. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *Journal of proteome*. 2010;9(5):2191–9.
22. Yaprak E, et al. The prominent proteins expressed in healthy gingiva: a pilot exploratory tissue proteomics study. *Odontology*. 2018;106(1):19–2
23. O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1975, 250(10). Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/236308/>
24. Del M, Durán Márquez P, Gestión Y, Luis A. UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA ESCUELA DE POST GRADO [Internet]. Core.ac.uk. [citado

- el 9 de octubre de 2023]. Disponible en:
<https://core.ac.uk/download/pdf/198129255.pdf>
25. Schroeder H, Cavacini L. Structure, and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2): S41–52.
26. Vletter, E. M, Koning, M. T., Scherer, H. U., Veelken, H., & Toes, R. E. M. A Comparison of Immunoglobulin Variable Region N-Linked Glycosylation in Healthy Donors, Autoimmune Disease and Lymphom. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020;11. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00241>
27. Tang H, Yuan C, Ma Z, Zhu C, Tong P, Gallagher JE, et al. The potentiality of salivary peptide biomarkers for screening patients with periodontal diseases by mass spectrometry. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019; 495:278–86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31026423/>
28. Andrianus EP, Masulili SLC, Lessang R, Tadjoeidin FM, Hutomo DI, Wulandari P, et al. Immunoglobulin G Levels in the Gingival Crevicular Fluid of Menopausal Patients with Periodontitis. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr* [Internet]. 2021;21: e5940. Available from:
<https://doi.org/10.1590/pboci.2021.080>
29. Yuan C, Ma Z, Tong P, Yu S, Li Y, Gallagher JE, et al. Peptidomic changes of saliva after non-surgical treatment of stage I/II generalized periodontitis. *Oral Dis* [Internet]. 2022;28(6):1640–51. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1111/odi.13838>
30. Theilgaard-Monch K. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in

- response to activation. Blood [Internet]. 2006 ;108(1):353–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16543473/>
31. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes Dev [Internet]. 2006;20(23):3199–214. Disponible en: <http://genesdev.cshlp.org/content/20/23/3199.abstract>
32. Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, et al. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. EMBO J [Internet]. 1993; 12(6):2249–56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8508762/>
33. Ning Y, Deng C, Li C, Peng W, Yan C, Ran J, et al. PCDH20 inhibits esophageal squamous cell carcinoma proliferation and migration by suppression of the mitogen-activated protein kinase 9/AKT/ β -catenin pathway. Front Oncol [Internet]. 2022;12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36248995>
34. Feldheim J, Wend D, Lauer MJ, Monoranu CM, Glas M, Kleinschnitz C, et al. Protocadherin gamma C3 (PCDHGC3) is strongly expressed in glioblastoma and its high expression is associated with longer progression-free survival of patients. Int J Mol Sci [Internet]. 2022; 23(15):8101. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35897674/>
35. Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2001;58(7):902–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/pl00000910>
36. Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, Novelli F. A-enolase: A promising therapeutic and diagnostic tumor target: A-enolase in tumor diagnosis and

- therapy. FEBS J [Internet]. 2011; 278(7):1064–74. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21261815/>
37. Chapman EA, Lyon M, Simpson D, Mason D, Beynon RJ, Moots RJ, et al. Caught in a trap? Proteomic analysis of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Front Immunol [Internet]. 2019;10. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00423>
38. Davis IJ, Jones AW, Creese AJ, Staunton R, Atwal J, Chapple ILC, et al. Longitudinal quantification of the gingival crevicular fluid proteome during progression from gingivitis to periodontitis in a canine model. J Clin Periodontol [Internet]. 2016;43(7):584–94. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12548>
39. Bellei E, Bertoldi C, Monari E, Bergamini S. Proteomics disclose the potential of gingival crevicular fluid (GCF) as a source of biomarkers for severe periodontitis. Materials (Basel) [Internet]. 2022; 15(6):2161. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/1996-1944/15/6/2161>

ANEXOS:

**ANEXO 1: SOLICITUD DIRIGIDA AL COORDINADOR PRINCIPAL DEL
LABORATORIO DE QUÍMICA Y PROTEÍNAS DE LA UCSM:**

Solicito: Autorización para uso de laboratorio.

**DOCTOR LUIS PONCE SOTO
COORDINADOR PRINCIPAL DEL LABORATORIO DE QUÍMICA Y
PROTEÍNAS F-401**

Yo **VIVIANA FERNANDA TEJADA ALFEREZ**, identificada con DNI n° 71225994 y el código de alumno 2017202962, Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología, de la UCSM, con el debido respeto me presento ante Usted y expongo:

Que, en razón de realizar el desarrollo experimental de mi Proyecto de Tesis Profesional en Odontología, titulado: "ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. Arequipa, 2023" y siendo que su Laboratorio cuenta con la plataforma tecnológica y experiencia profesional en los estudios de Análisis Proteómico, es que, como Bachiller de la Escuela de Odontología de la UCSM, por lo cual solicito a Ud. tenga a bien **brindar la autorización para la realización de mi Proyecto de Tesis** descrito anteriormente, así como el **apoyo científico tecnológico de su Laboratorio**, bajo el apoyo de mi Asesor de Tesis Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda.

POR LO EXPUESTO

Ruego a usted acceder a mi solicitud

Arequipa, 25 de septiembre del 2022



Viviana Fernanda Tejada Alferez
DNI 71225994

ANEXO 2: AUTORIZACIÓN DE USO DEL LABORATORIO DE QUÍMICA Y PROTEÍNAS DE LA UCSM:

Arequipa, 30 de septiembre del 2022

Señorita
Bach. Viviana Fernanda Tejada Alferéz
Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Presente. –

Ref: Respuesta de Solicitud de uso de laboratorio

A tiempo de saludarla me dirijo a su persona para comunicar mi **autorización para uso de Laboratorio de Química y Proteína F—401**. En virtud de la realización del Proyecto de Tesis Profesional en Odontología, titulado: "ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. Arequipa 2023.

Sin más agradezco toda su atención.

Atentamente,



Professor Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

**COORDINADOR PRINCIPAL DEL LABORATORIO DE QUÍMICA Y
PROTEÍNAS F-401**

ANEXO 3: INSTRUMENTO – FICHA CLÍNICA

Paciente n°				
Presenta gingivitis (si/no)				
Origen de muestra				
Líquido Gingival Crevicular				
Número de spots diferenciales encontrados				
0	1	2	3	4

ANEXO 4: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UCSM.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Arequipa, 10 de julio de 2023

Investigadora Viviana Fernanda Tejada Alferez

Presente. -

De mi especial consideración.

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación de su proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación.

TÍTULO: “Análisis de expresión por aproximación proteómica de marcadores moleculares en el proceso inflamatorio gingival. Arequipa, 2023”.

Investigadora a cargo de la investigación: Viviana Fernanda Tejada Alferez.

TIPO Y DISEÑO: Cualitativo, experimental, prospectivo, transversal, comparativo.

OBJETIVO: La investigación tiene como objetivo: Analizar la expresión proteómica de marcadores moleculares en el proceso inflamatorio gingival.



PROCEDIMIENTOS: Observación y medición.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

SUJETOS DE ESTUDIO:

5 muestras de tejido gingival saludable y 5 muestras de tejido gingival inflamado (gingivitis).

RIESGO DEL ESTUDIO:

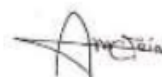
Mínimo

OBSERVACIONES, SUGERENCIAS:

Debe proteger confidencialidad de la data sensible

DICTAMEN:

DICTAMEN FAVORABLE
100 - 2023



Águeda Muñoz del Carpio Toia
Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com

ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES EN ESTUDIO.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Institución: Universidad Católica de Santa María

Investigadores: Alumna: Viviana Fernanda Tejada Alferez
Asesor: Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda

Título: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. Arequipa, 2023.

INTRODUCCIÓN:

Lo estamos invitando a participar del estudio de investigación llamado: "ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROCESO INFLAMATORIO GINGIVAL. Arequipa, 2023.". Este es un estudio desarrollado por la alumna Viviana Fernanda Tejada Alferez, junto a su asesor Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

Estamos realizando este estudio con el objetivo de evaluar: **La expresión proteómica, en purificación de marcadores moleculares diferencial del tejido gingival inflamado (gingivitis), respecto del tejido gingival sano. Al mismo tiempo, buscamos detectar marcadores moleculares, y secuencia proteica que podría expresarse en la enfermedad periodontal del tejido gingival inflamado (gingivitis), respecto del tejido gingival sano.** Por lo señalado creemos necesario profundizar más en este tema y abordarlo con la debida importancia que amerita.

METODOLOGÍA:

Si usted acepta participar, le informamos que se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

1. Líquido crevicular gingival. (Pacientes con gingivitis)
2. Líquido crevicular gingival. (Pacientes con tejido gingival sano)

MOLESTIAS O RIESGOS:

No existe ninguna molestia o riesgo mínimo al participar en este trabajo de investigación. Usted es libre de aceptar o de no aceptar.

CONFIDENCIALIDAD:

Los investigadores registraremos su información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados en una revista científica, no se mostrará ningún dato que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

DERECHOS DEL PACIENTE:

Si usted decide participar en el estudio, podrá retirarse de éste en cualquier momento, o no participar de una parte del estudio sin perjuicio alguno. Si tiene alguna duda adicional, puede preguntar a la alumna Viviana Fernanda Tejada Alferez o llamarla al teléfono 956763786 o comunicarse Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda.

CONSENTIMIENTO:

Acepto voluntariamente participar en este estudio, he comprendido perfectamente la información que se me ha brindado sobre las cosas que van a suceder si participo en el proyecto, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

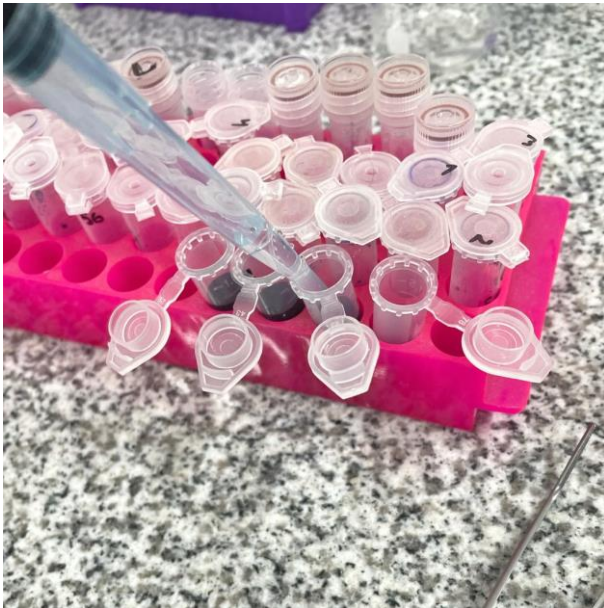
NOMBRE:

FIRMA:

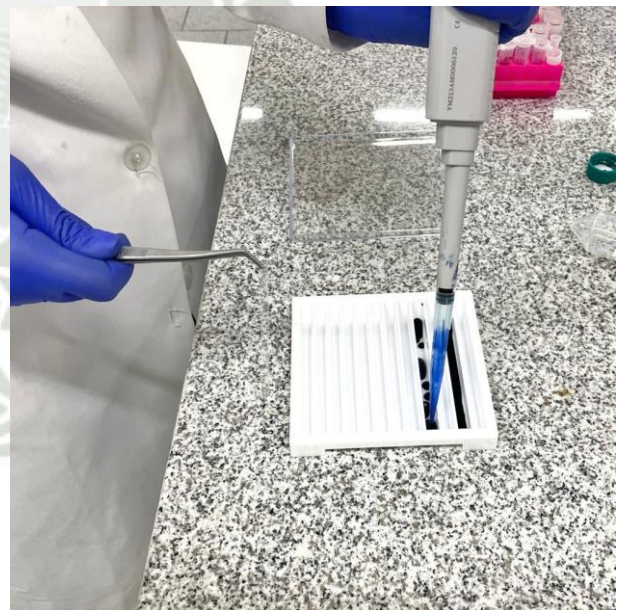
DNI:

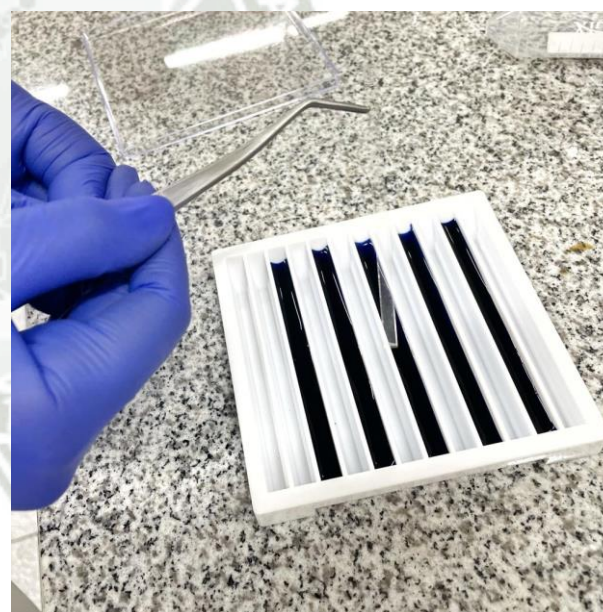
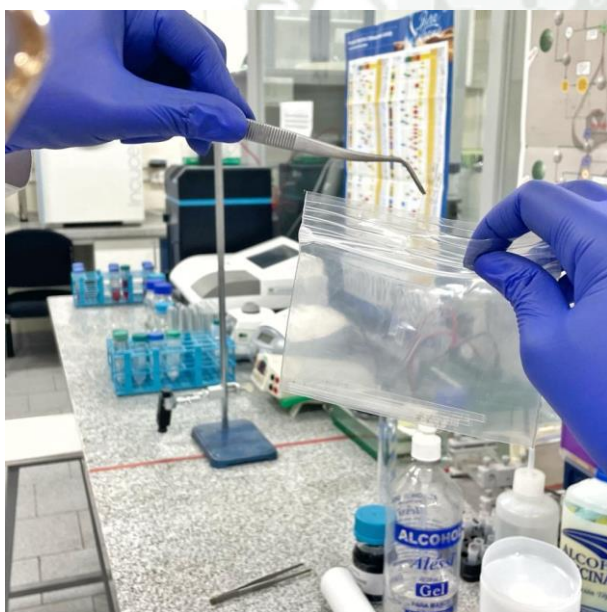
ANEXO 6: FOTOGRAFÍAS LABORATORIALES

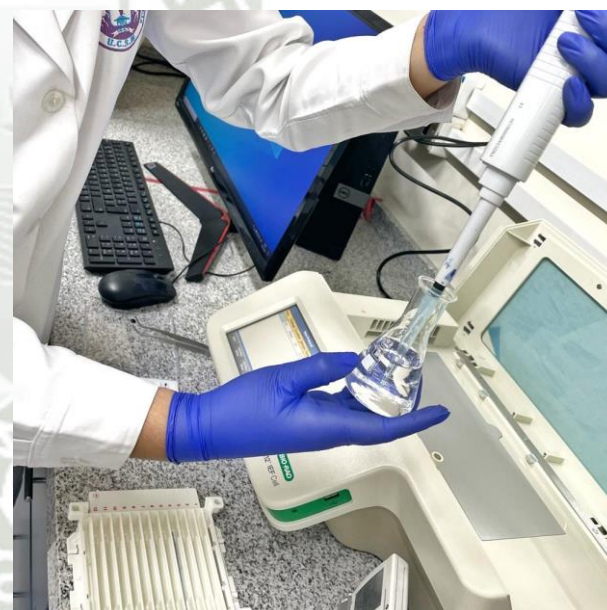
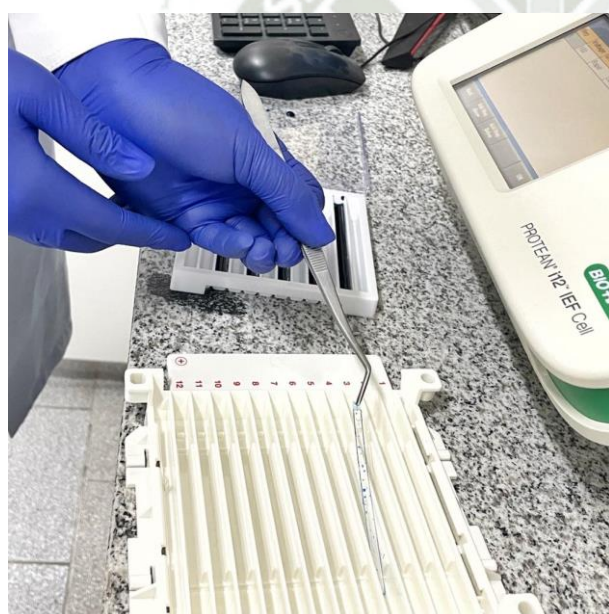
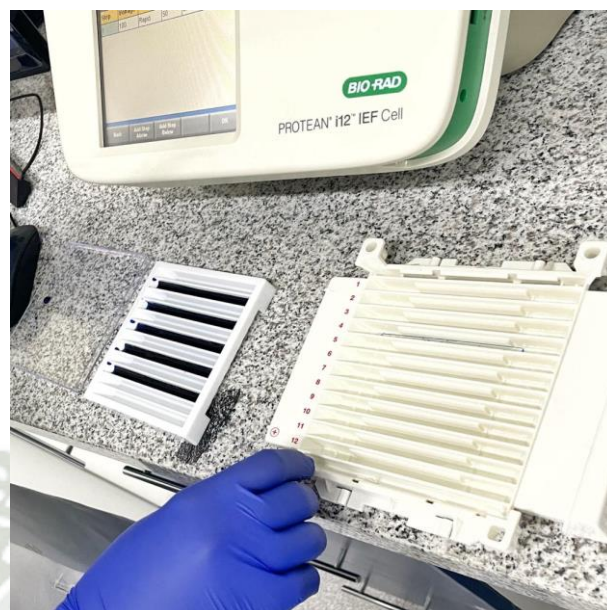
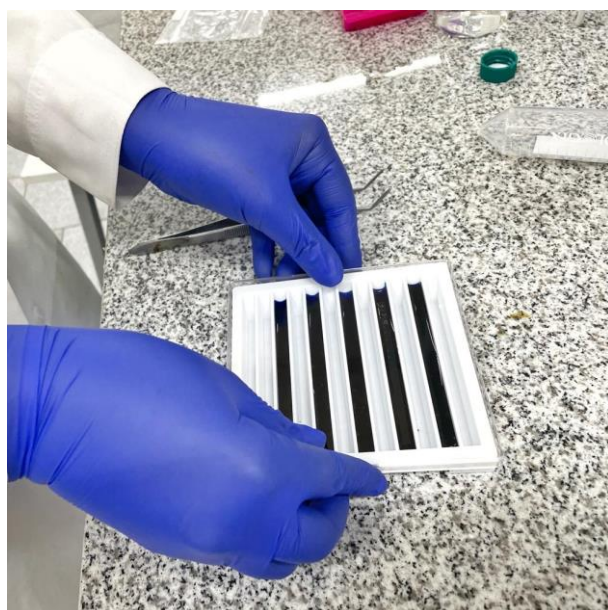
Preparación de muestras

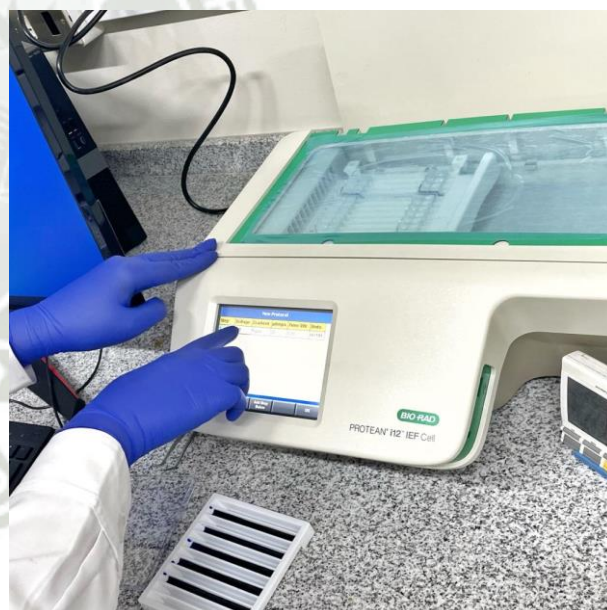
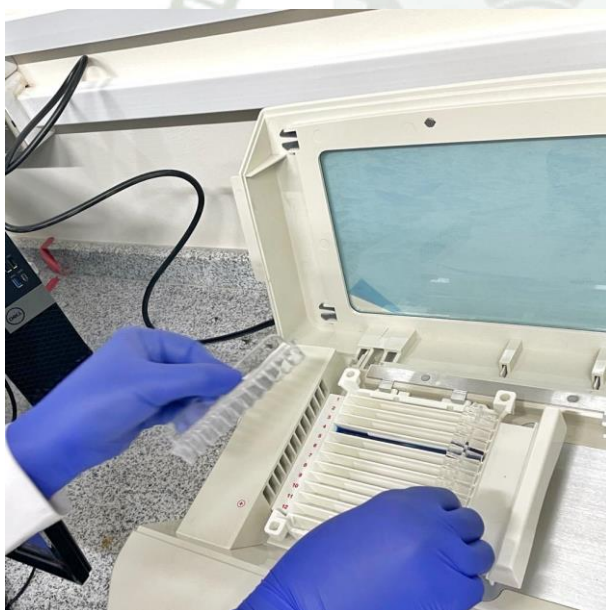
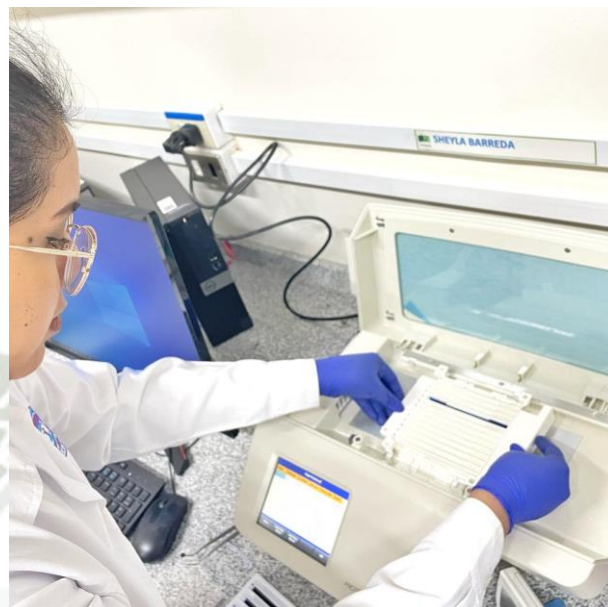
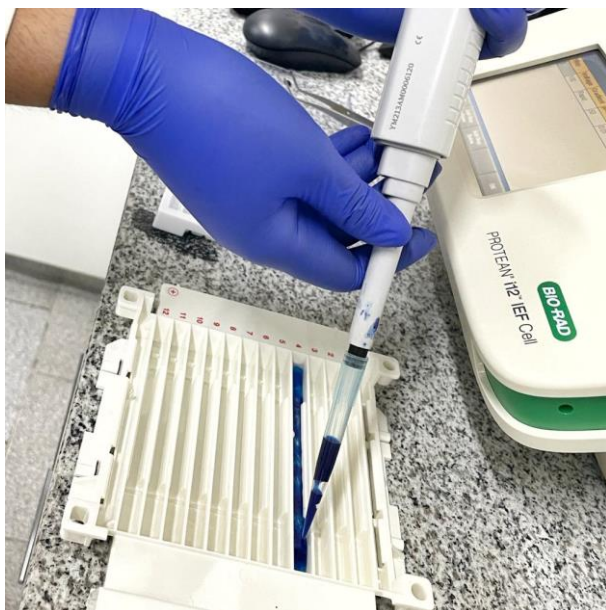


Preparación de strip primera dimensión





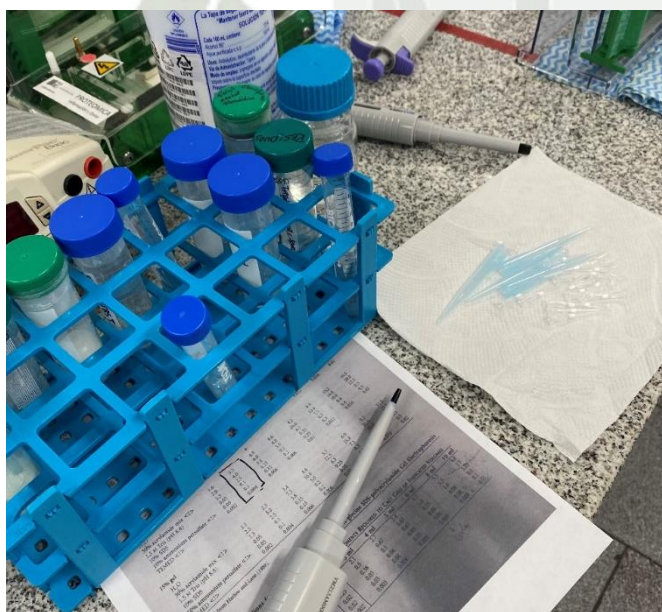




Preparación de gel:



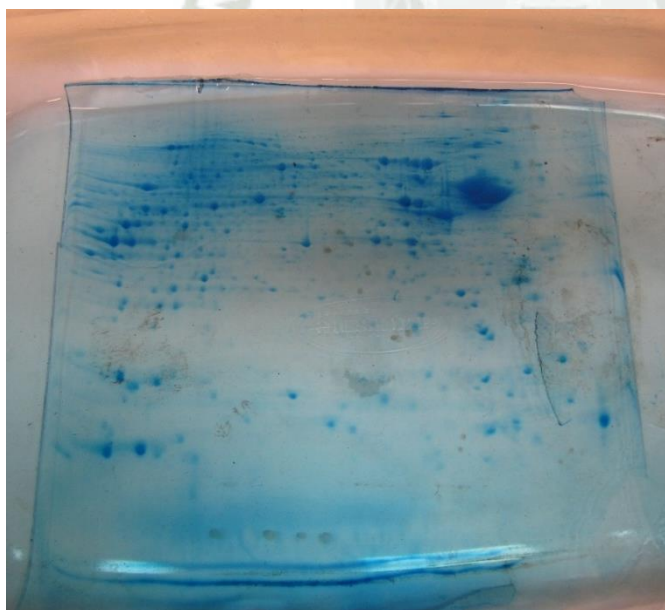
Gel de electroforesis:



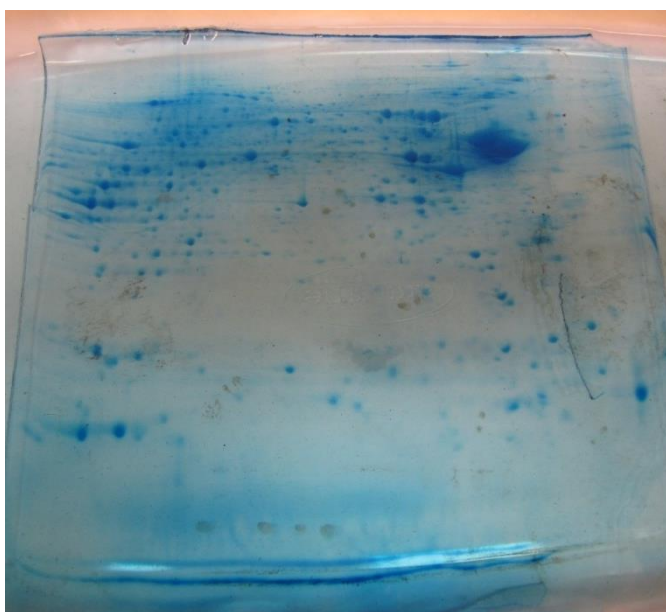
Colocación de muestras en gel de electroforesis:



Gel 2D saludable

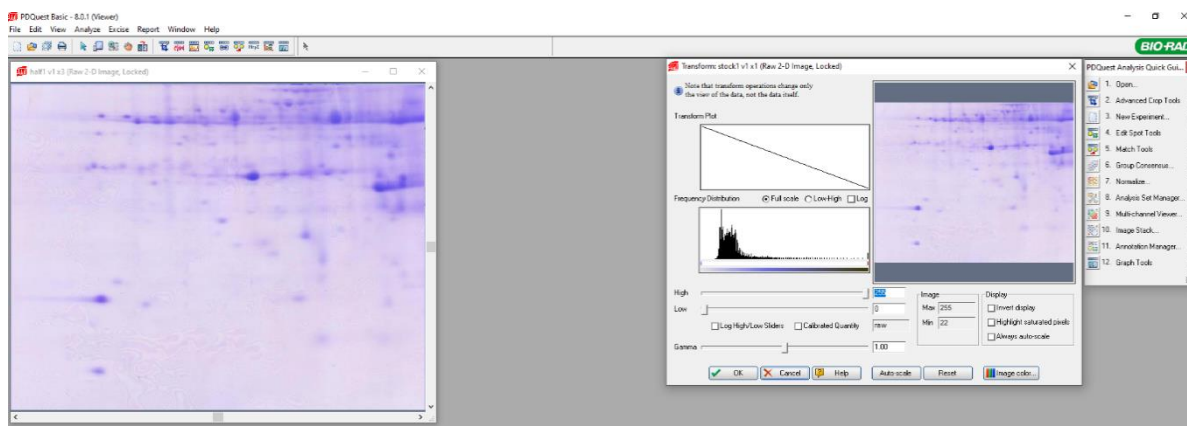


Gel 2D Tejido inflamado

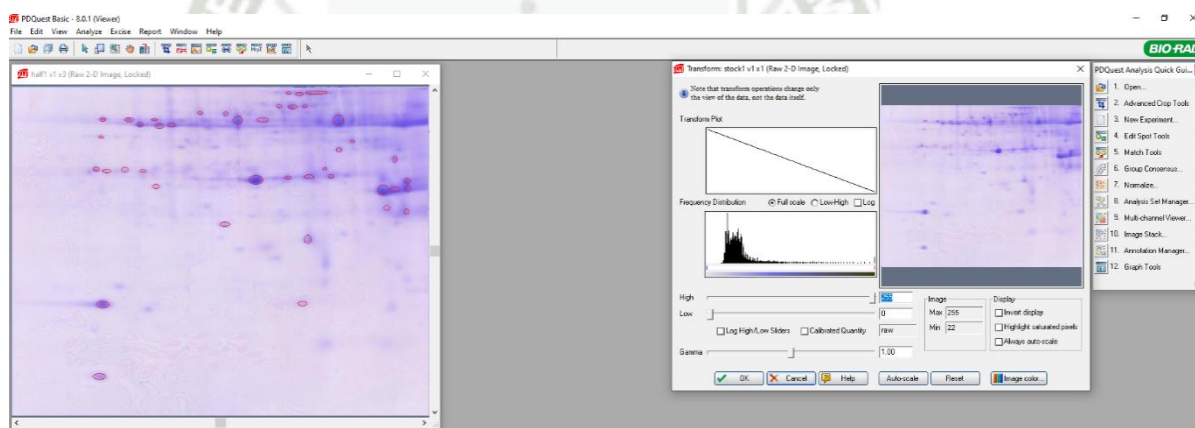


ANEXO 7: CORRIDA 2D EN SEGUNDA DIMENSIÓN

1. Control (Mapa de Referencia)

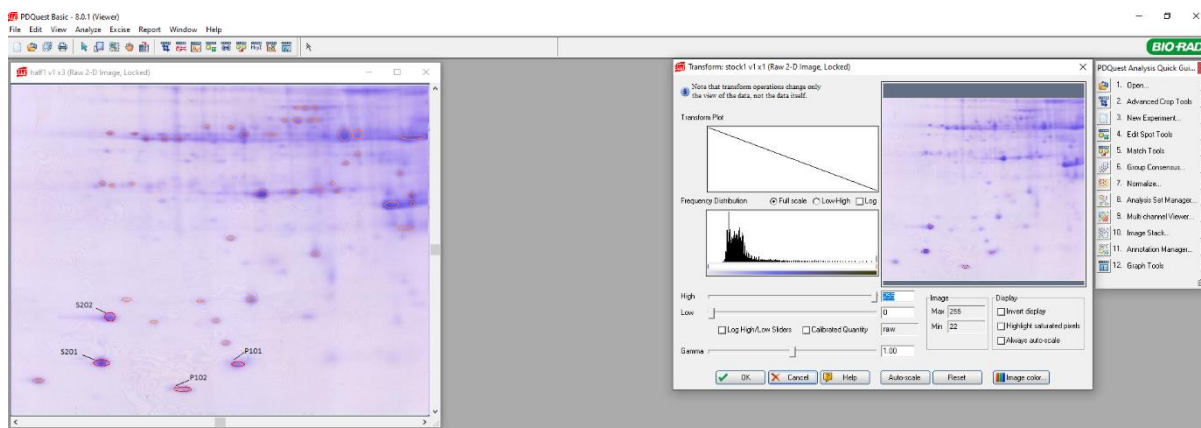


2. Digitalización Control (Software PDQuest)



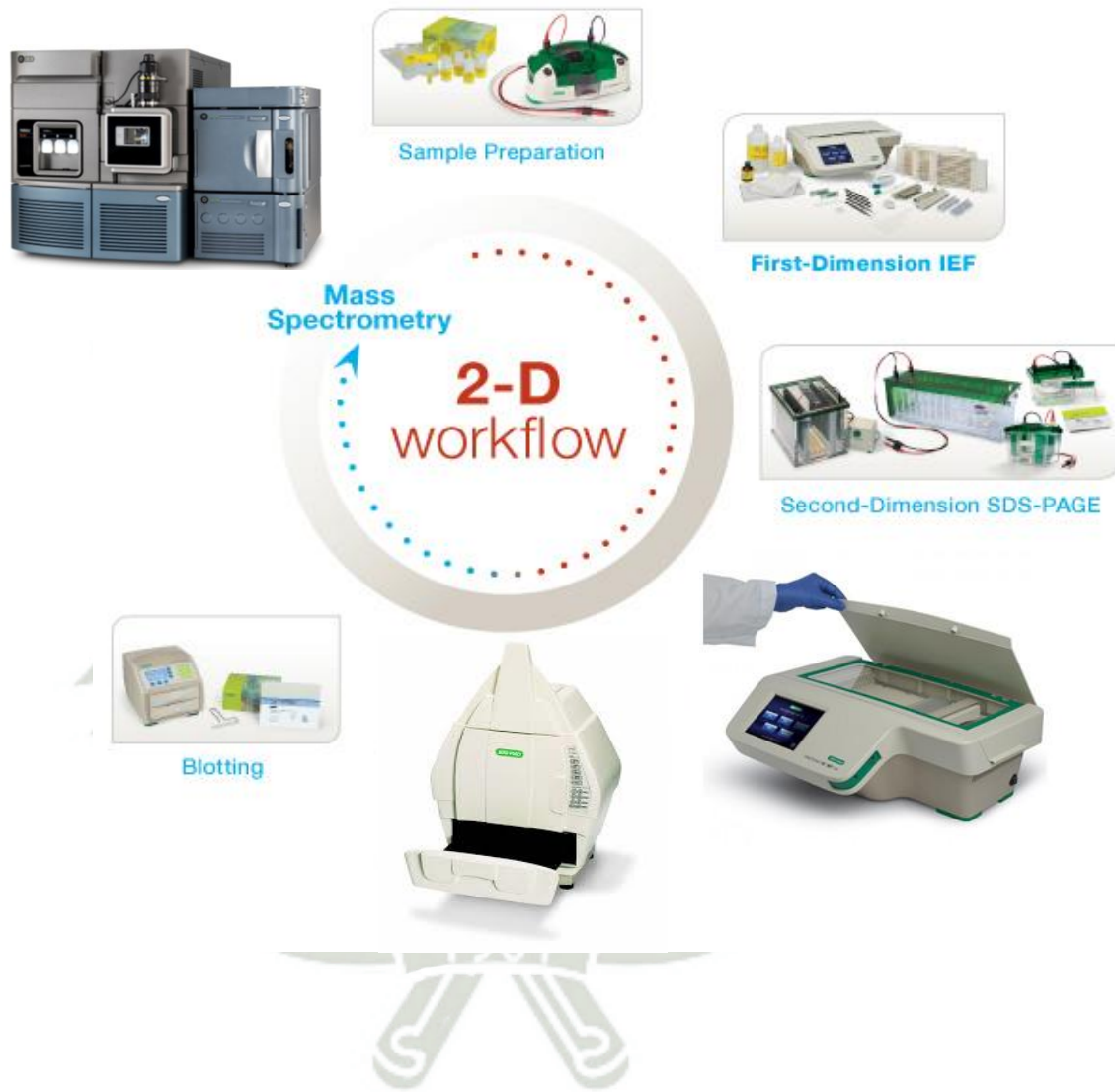
<i>Nro. De Spots (Control)</i>
42 spots

3. Digitalización tratamiento (Software PDQuest)



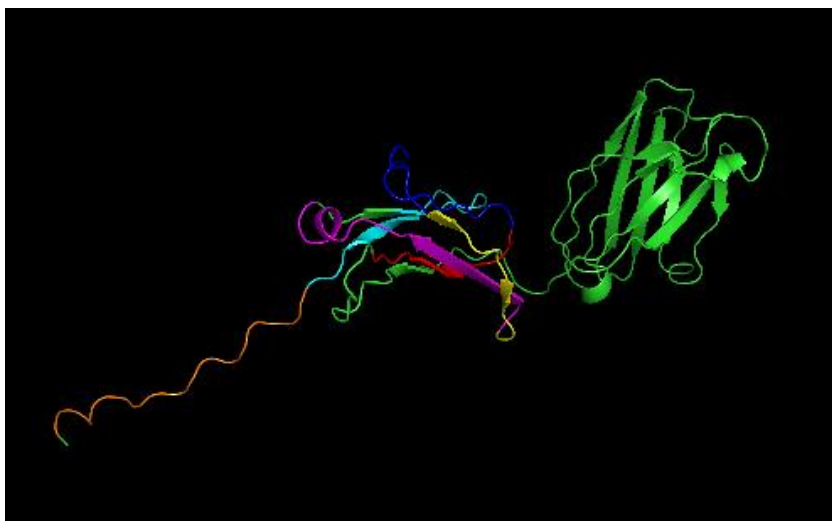
Nro. De Spot (Gingivitis)	Tejido saludable	Estudio
46 spots	42	Spots P101, P102, S201 y S202

ANEXO 8: FLUJOGRAMA DE TRABAJO



ANEXO 9: DOCKING

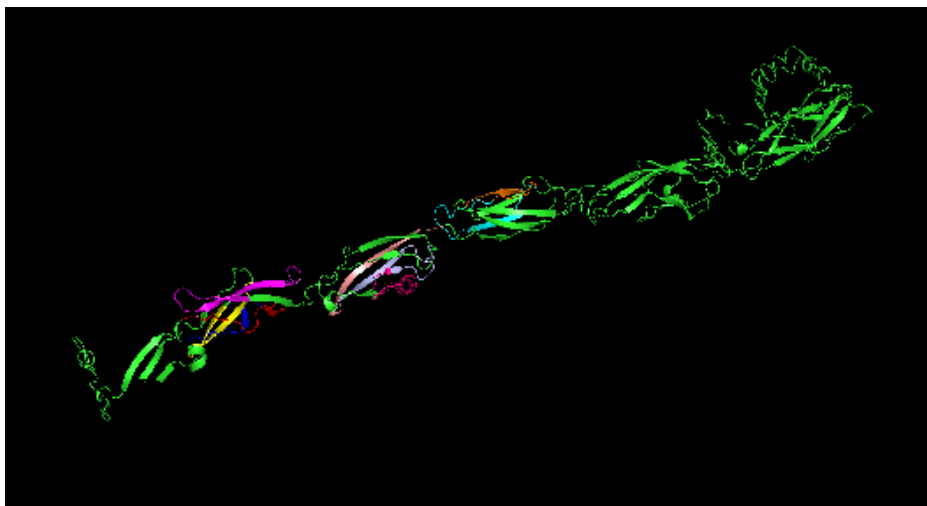
1. Región variable de inmunoglobulina:



2. Haptoglobina:



3. Protocadherina beta 12:



4. Alfa enolasa:

