



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**“Validación de biomarcadores para la detección de cáncer gástrico
asociado a *Helicobacter pylori*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:
Biol. ANA SILVIA ARENAS LINARES

COMITÉ DE TESIS:

CO DIRECTORA: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

CO DIRECTORA: DRA. GUADALUPE AYALA AGUILAR

ASESORES:

DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN
DR. ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el sistema de becas del posgrado con número de becario ---.



A la Dra. Elba Cristina Villegas Villareal y al Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



Instituto Nacional
de Salud Pública

El apoyo otorgado al proyecto "Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas premalignas y de transformación a cáncer por medio de electroforesis bi-dimENSIONAL y espectrometría de masas (LC-MS) Número 2011-CO1-162358-FOSSIS desarrollado en el departamento de Interacción Epidemiológica del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar.

Este trabajo de tesis representa la culminación de 2 años de trabajo.

Muchas son las personas que hicieron sus aportes y me acompañaron en esta etapa de diferente manera, algunas quizá sin haberse dado cuenta, pero todas ellas fundamentales en cada momento.

A mis padres, por permitirme tomar mis decisiones con libertad, apoyándolas e impulsándolas, respetando y aceptando aún aquellas que no comparten. Por todo su amor incondicional y su generosidad infinita. ¡Eternamente gracias!

A mis amigos, a todos, a quienes conocí antes o durante mi tesis. Les quiero agradecer por haber estado siempre a mi lado de mil maneras diferentes y en cualquier situación, por brindarme siempre una amistad plena e incondicional con todo lo que eso implica y en especial por hacerme sentir que no importa que pase, seguirán estando. ¡Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Cáncer gástrico	3
Factores de riesgo de Cáncer gástrico.....	4
Factores genéticos	4
Factores ambientales.....	5
Factores dietéticos.....	5
Factores relacionados con el estilo de vida del paciente.....	6
Factores infecciosos	6
<i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	6
Epidemiología de la infección por <i>H. pylori</i>	6
Características de <i>H. pylori</i>	7
Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i>	8
Infección aguda	9
Gastritis	9
Gastritis crónica (GC).....	9
Metaplasia intestinal (MI).....	10
Cáncer Gástrico (CG)	10
Métodos para la detección de CG	12
Marcadores en el cáncer gástrico.....	12
Proteómica.....	13
Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas	13
Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4 (ITIH4)	14
La proteína de unión a vitamina D (DBP)	15
Clusterina (CLU).....	16
JUSTIFICACIÓN	20

HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL	20
Objetivos específicos	20
METODOLOGÍA.....	21
Población de estudio.....	21
Métodos experimentales	21
Toma y manejo de muestras biológicas	21
Eliminación de albúmina e inmunoglobulinas	21
Cuantificación de proteínas	22
Gel de integridad	23
Detección de anticuerpos mediante Western blot	24
Electroforesis en gel	24
Transferencia gel membrana	24
Inmunodetección de proteínas	24
Análisis de imágenes	25
Análisis estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Características generales de la población de estudio	27
Selección de muestras de plasma para el estudio de validación	27
Verificación de la calidad de las muestras de plasma	28
Limpieza de las muestras de estudio y cuantificación de proteínas	30
Gel de integridad	32
Proteína ITIH4.....	33
Proteína DBP	35
Proteína CLU	38
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS.....	42
LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial de acuerdo con su localización (Asociación Internacional de Registros del Cáncer, GLOBOCAN 2012).	3
Figura 2. Micrografía de <i>H. pylori</i>	8
Figura 3. Modelo de carcinogénesis gástrica y factores de riesgo.....	11
Figura 4. Captura de pantalla del análisis de las imágenes de Western blot.....	26
Figura 5. Curva de calibración obtenida por método de Lowry a 595nm.	29
Figura 6. Perfil Electroforético de muestras de plasma. A) Muestra el perfil de 10 µg de plasma completo. B) Diferentes muestras de plasma diluidas (1:50) para cada muestra se colocaron 20 µg de proteína. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal.	30
Figura 7. Curva de calibración de concentración BSA vs absorbancia, obtenida por 2D Quant (GE Healthcare) a 490 nm.....	31
Figura 8. Perfil Electroforético de algunas muestras de plasma reducidas en BSA e IgGs, el gel se tiñó con azul de coomassie coloidal. M. Marcador de peso.1-10 (20µg de proteína de diferentes muestras de plasma).	32
Figura 9. inmunotransferencia representativo de los niveles de ITIH4 en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica (control) y con cáncer gástrico (casos).	33
Figura 10. Nivel de expresión de la proteína ITIH4 entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico (z=-0.562, *p=0.578). ^a Mediana [IIC], 2600 [1905-5530]. ^b Mediana [IIC], 3775 [2565-4445].	34
Figura 11. Inmunotransferencia representativa de los niveles de DBP en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica y con cáncer gástrico.	36
Figura 12 Nivel de expresión de la proteína DBP entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico (z=-1.83, *p=0.068). ^a Mediana [IIC], 480750 [344800-750000]. ^b Mediana [IIC], 345250 [184625-461625].	37
Figura 13. Inmunotransferencias representativas de los niveles de CLU en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica (control) y con cáncer gástrico (casos).	38
Figura 14. Nivel de expresión de la proteína CLU entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico (z=-2.543, *p=0.010). ^a Mediana [IIC], 28252.5 [9217.5-43425]. ^b Mediana [IIC], 4845.25 [2237.5-13388.75].	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencias de las principales causas de cáncer por aparato y sistema en México en mayores de 20 años INCAN, 2012.....	4
Tabla 2. Preparación de curva estándar	22
Tabla 3. Anticuerpos comerciales.....	25
Tabla 4. Características generales de los 124 pacientes incluidos en el estudio.....	27
Tabla 5. Grupo de pacientes seleccionados para la validación.	28
Tabla 6. Concentración de proteína de las muestras originales incluidas en el estudio.	29
Tabla 7. Concentración de proteínas de plasma reducidas en BSA e IgGs que forman parte de las muestras incluidas en el estudio.	31
Tabla 8. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de ITIH4 en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.....	34
Tabla 9. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de DBP en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.....	37
Tabla 10. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de CLU en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.....	39

RESUMEN

Actualmente, los métodos disponibles para la detección y la evaluación pronóstica del cáncer gástrico tienen una sensibilidad y una especificidad insuficientes, por lo cual nos son recomendables como pruebas diagnósticas. La identificación de nuevos biomarcadores es una necesidad urgente para su detección temprana de dicha enfermedad. Utilizando la proteómica comparativa basada en la estrategia del 2D-DIGE se analizaron diez muestras de plasma, 5 correspondían a casos de cáncer gástrico de tipo intestinal (CG) y 5 muestras de pacientes con gastritis crónica no atrófica (GCNA). Las imágenes 2D-DIGE generadas se analizaron estadísticamente utilizando el software DeCyder™ 2D. Las proteínas expresadas diferencialmente se identificaron por espectrometría de masas con un MALDI-TOF-MS, con los espectros MS/MS obtenidos se realizó análisis bioinformático comparativo. Se pudo detectar un grupo de proteínas que mostraron una expresión diferencial, por un factor de 2 o más veces, entre los dos grupos. Además, en base a los antecedentes de la literatura se seleccionaron tres proteínas: Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4 (ITIH4), proteína de unión a vitamina D (DBP) y Clusterina (CLU). El objetivo fue determinar la asociación entre los niveles de expresión en plasma de las proteínas ITIH4, DBP y CLU, mediante inmunoblot en pacientes con gastritis crónica no atrófica (GCNA) y cáncer gástrico (CG). En la metodología se incluye la validación la cual se realizó por western blot utilizando el plasma de pacientes con GCNA y CG. Las diferencias en los niveles expresión de cada una de estas proteínas en las muestras de plasma se determinó mediante la prueba Mann-Whitney. Los resultados muestran que para ITIH4 no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, mientras que la expresión de CLU fue significativamente menor para el grupo de CG ($p=0.010$) y para la proteína DBP la expresión se encontró en menor concentración en los pacientes con cáncer gástrico, sin embargo, fue marginalmente significativa ($p<0.068$). Conclusiones los resultados sugieren a la proteína clusterina podría usarse como posible biomarcador para el diagnóstico de CG a través de una prueba no invasiva.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG), constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer en nuestro país, la progresión de epitelio normal a células tumorales puede implicar, por lo menos, tres etapas secuenciales: Etapa no maligna que incluye la gastritis superficial (GS) y la gastritis crónica no atrófica (GCNA); Etapa pre-maligna que incluye metaplasia intestinal (MI) y displasia (DI); etapa maligna que ya es el cáncer gástrico (CG). Estos cambios de la mucosa gástrica pueden ocurrir durante un período extenso de muchos años como resultado de la exposición a una variedad de factores exógenos y endógenos que causen alteraciones genéticas. Estas condiciones no malignas, como la GS y la GCNA tienen períodos de latencia prologados, por lo que serían las etapas ideales para la detección temprana del CG mediante antígenos, sin embargo, se conoce muy poco acerca de los cambios moleculares involucrados en la evolución entre estas dos etapas no malignas del CG.

Por otra parte, existen proteínas antigénicas que sirven como biomarcadores para la detección y la evaluación pronóstica del CG. Entre las proteínas antigénicas que se han identificado en CG se encuentran los antígenos CA 72.4, CEA y CA 19.9, sin embargo, poseen baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de CG; es por tal razón, la identificación de nuevas moléculas antigénicas con potencial para ser utilizados en la detección de CG en forma temprana, es un área de oportunidad para el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico más sensibles, específicas y al mismo tiempo no invasivas.

Mediante análisis proteómico comparativo de plasma de pacientes con GCNA y CG fueron identificadas tres proteínas con potencial para ser biomarcadores: a) Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4 (ITIH4), b) La proteína de unión a vitamina D (DBP) y c) Clusterina (CLU). En este trabajo se propone validar la frecuencia y los niveles de dichas proteínas en muestras de plasma de pacientes diagnosticados con GCNA y CG, para proponerlos como posibles biomarcadores en la detección temprana de Cáncer gástrico.

ANTECEDENTES

Cáncer gástrico

De acuerdo con la Asociación Internacional de Registros del Cáncer, la localización más frecuente de las neoplasias malignas por aparato o sistema en el año 2014 fueron: pulmón 17%, mama 12%, colon y recto 10%, próstata 8%, estómago 7%, hígado 6%, cérvix 4%, que corresponden a 64% (Figura 1) (GLOBOCAN 2012).

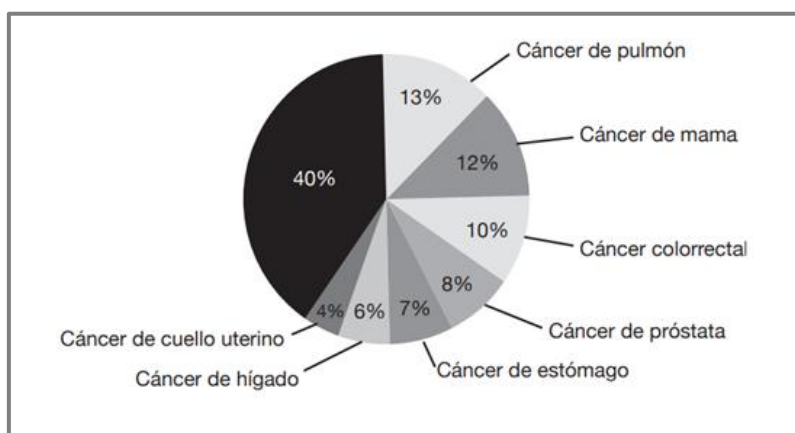


Figura 1. Distribución de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial de acuerdo con su localización (Asociación Internacional de Registros del Cáncer, GLOBOCAN 2012).

El cáncer gástrico representó el quinto cáncer más común a nivel mundial y el segundo lugar en cuanto a mortalidad por cáncer, sin embargo, la mortalidad por CG es menor en países desarrollados los cuales tienen una tasa de mortalidad que oscila entre 3.8 y 7.2% x 100,000 habitantes, en comparación con los países en vías de desarrollo en los cuales la tasa se incrementa, alcanzando en algunos sitios 13 x 100,000 habitantes (GLOBOCAN 2012; Perry *et al.*, 2012).

En México el comportamiento epidemiológico del cáncer gástrico se encuentra vinculado a las características geográficas de la población, sus diferentes estilos de vida, marginación, pobreza y escasos recursos económicos destinados a la atención de la salud, lo cual condiciona un grave problema de salud pública (INEGI 2015). Los estados con mayor mortalidad por cáncer gástrico son: Chiapas, 8.1; Oaxaca, 7.3; Ciudad de México, 6.8; Guerrero, 6.6 y Morelos, 6.5 (x 100,000 habitantes) (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2018), siendo el segundo en cuanto a mortalidad, con una tasa de 5.6 por cada 100,000 habitantes (Sánchez-Barriga *et al.*, 2016).

De acuerdo al género, en el masculino el cáncer gástrico ocupa el cuarto lugar después del de próstata, pulmón y colorrectal con 4,104 casos, de igual manera en mujeres ocupa el cuarto lugar después del cáncer cervicouterino, mama, colorrectal con 3,576 casos (**Tabla 1**) (INEGI 2015).

Tabla 1. Frecuencias de las principales causas de cáncer por aparato y sistema en México en mayores de 20 años INCAN, 2012

HOMBRE			MUJER		
Lugar	Órgano	N	Lugar	Órgano	n
1	Próstata	14,016	1	Mama	20,444
2	Pulmón	5,471	2	Cervicouterino	13,960
3	Colorrectal	4,656	3	Colorrectal	3,995
4	Estómago	4,104	4	Estómago	3,576
5	Leucemia	3,363	5	Hígado	3,319
TOTAL		65,540	TOTAL		82,445

En México, entre los años 2002-2012, fallecieron por CG 69,107 pacientes. En 2000 hubo 5,003 muertes y en 2012, 5,459 individuos fallecieron por esta enfermedad (Sánchez-Barriga *et al.*, 2016).

El CG es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla por medio de procesos prolongados que puede durar 20 años o más, etiológicamente, se asocia con factores genéticos, factores ambientales, así como a la infección por *H. pylori*.

Factores de riesgo de Cáncer gástrico

Factores genéticos

En pocos casos, el cáncer gástrico puede estar relacionando con factores genéticos. Pero como la mayoría de los canceres epiteliales, el CG se caracteriza por mutaciones somáticas en varios genes, de 50 a 70 por tumor. Entre las alteraciones genéticas más comunes y frecuentes se incluyen mutaciones en el gen TP53, presentando aberraciones hasta en 50% de los casos y en forma no sorprendente se asocia con peor pronóstico clínico, reflejando la función celular del TP53 como el guardián de la integridad de genoma, (Hanazono *et al.*, 2006). En el cáncer gástrico también se encuentran mutaciones en oncogenes como (*KRAS*, *CTNNB1*, *PIK3CA*) y genes supresores tumorales P53, P73 están cambiando, Bcl-2 y APC. Genes que reparan daños en el ADN son responsables de detectar y reparar cambios a otros genes y factores desencadenantes de su función una acumulación gradual de mutaciones, además, cualquier expresión incontrolada de P16, p27 y Rb, CDC25B, E2F da lugar a una

inestabilidad genómica, a la proliferación celular incontrolada y el desarrollo de un tumor gástrico (Gramsch *et al.*, 2013).

Otro factor genético que contribuye a la aparición del cáncer gástrico en forma directa es el gen E-cadherina (CDH1) con un alto riesgo del cáncer gástrico. El cáncer gástrico difuso hereditario es una forma poco común y fatal del cáncer que puede surgir de mutaciones del gen CDH1. Los padres con esta mutación genética tienen un 50% de posibilidad de transmitir ésta a su descendencia (Wang *et al.*, 2014).

Factores ambientales

Factores dietéticos

Dieta alta en sal: el consumo de alimentos salados es un factor de riesgo de CG, como lo son los alimentos preservados en sal, estos incluyen a los vegetales preservados en salmuera y pescado salado seco, así como también los alimentos ricos en sal (como es el caso de la salsa de soya) o el uso exagerado de sal de mesa (World Cancer Research Fund 2016) y esto es debido a una alta concentración de sal en el estómago destruye la barrera mucosa y puede contribuir a la inflamación crónica y atrofia, lo cual a su vez incrementa el riesgo de CG (Karimi *et al.*, 2014).

Carne procesada: La carne procesada (curada, ahumada, salada o con adición de conservadores) es una fuente de compuestos N-nitrosos. Algunos ejemplos de carnes procesadas son la carne seca, hamburguesas, tocino, salami y salchichas, entre otras variedades de carnes frías (Hamad *et al.*, 2015). Muchas carnes procesadas tienen alto contenido en sal, nitritos y nitratos que reaccionan con los productos de degradación de las proteínas formando compuestos mutagénicos y carcinogénicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) procedentes del combustible utilizado en el proceso de ahumado (World Cancer Research Fund 2016).

Carnes a las brasas: Existen algunos estudios que sugieren que la carne roja, blanca o pescado preparado a las brasas (al carbón o a la leña) podría ser un factor de riesgo para CG, ya que la carne cocida a altas temperaturas aumenta la presencia de carcinógenos y mutágenos del tipo de aminas heterocíclicas y PAH y α -bezopireno (World Cancer Research Fund 2016).

Factores relacionados con el estilo de vida del paciente

Tabaquismo: La IARC estableció en el 2012 que existe evidencia suficiente para proponer una relación de causalidad entre el tabaquismo y CG, la cual parece ser dosis-dependiente. El tabaco tiene más de 5000 compuestos químicos de los cuales 93 (Incluyen hidrocarburo aromático policíclico (PAH), carbonilos, nitrosaminas específicas del tabaco y metales tóxicos) (Hamad *et al.*, 2015). Algunos estudios sugieren que entre el 11-17% de los casos de CG son atribuibles al tabaquismo. Los pacientes fumadores tienen mayor riesgo de presentar CG que los no fumadores. El impacto del tabaquismo sobre el riesgo de presentar CG es mayor en el sexo masculino que en el femenino (Karimi *et al.*, 2014).

Ingesta de alcohol: Algunos estudios han demostrado que la ingesta de 3 o más bebidas alcohólicas al día aumentan el riesgo de CG. El alcohol es un irritante gástrico, actúa como solvente permitiendo la penetración de carcinogénesis (Lee *et al.*, 2013).

Factores infecciosos

Helicobacter pylori (H. pylori)

En 1983, Marshall y Warren demostraron que *H. pylori* es la causa principal de gastritis y ulcera péptica; en 1994, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I, por lo que se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CG (Kusters *et al.*, 2006; Testaman *et al.*, 2014). Algunos estudios sugieren que es responsable de 74% de los casos de CG no cardial en países desarrollados y 78% en países en vías de desarrollo (Mbulsiteye *et al.*, 2010).

En el 2001 se demostró que el desarrollo de CG se presenta sólo en pacientes infectados por *H. pylori*, en este estudio se hizo un seguimiento de 1246 pacientes infectados, de los cuales 36 (2.9%) desarrollaron cáncer y de los 280 no infectados ninguno desarrolló la enfermedad (Uemura *et al.*, 2001).

Epidemiología de la infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* representa un problema de salud pública a nivel mundial, se estima que aproximadamente el 50% de la población mundial se encuentra infectado por esta bacteria la cual es causante de patologías gástricas como gastritis aguda y crónica, ulcera péptica y cáncer gástrico (Sitarz *et al.*, 2018).

La prevalencia de la infección varía entre países y poblaciones del mismo país; dicha prevalencia está relacionada de manera importante con condiciones tanto socioeconómicas como higiénicas; se ha estimado que en países desarrollados la colonización por *H. pylori* es del 10 al 50% de la población, mientras que en los países en vías de desarrollo alcanza cifras del 80 al 90% (Burkitt *et al.*, 2017).

En 1998 se realizó un estudio sero-epidemiológico de la infección por *H. pylori* en México, -iniciado en 1997-, se efectuó con sueros representativos de la población de todos los estados de la República Mexicana; la muestra incluyó a 11,605 sueros procedentes de personas con edades de 1 a 90 años; en sus resultados se advierte que el 20% de los niños de 1 año de edad mostraron anticuerpos para *H. pylori*, que la sero-positividad aumentó progresivamente a cifras de 50% en niños de 10 años, lo que demuestra que en México como país en desarrollo la infección se adquiere desde la infancia, alcanzando cifras del 80% en población joven con edades de 18 a 20 años, y de que la seropositividad aumenta un 5% cada año en los primeros 10 años de vida (Torres *et al.*, 1998).

Características de *H. pylori*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Epsilon Proteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género: Helicobacter

Especie: *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria Gram negativa, en forma de espiral que mide alrededor de 0,5 a 1,0 μm de ancho y de 2,5 a 4,5 μm de largo (González y Rodríguez 2011). Posee de dos a seis flagelos unipolares que le ayudan a colonizar la mucosa gástrica, lo que le confiere movilidad en el ambiente viscoso para resistir las contracciones gástricas (**Figura 2**) (Kusters *et al.*, 2006).

La bacteria presenta factores de virulencia que le permiten colonizar y sobrevivir en el medio hostil de la mucosa gástrica. *H. pylori* produce la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea produciendo CO_2 y NH_4 , creando un ambiente neutro alrededor de la bacteria lo que le permite sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, la bacteria presenta una estructura en espiral que le permiten desplazarse hacia las células epiteliales (Peixoto *et al.*, 2016). Para evitar su eliminación dentro de la

mucosa, la bacteria contiene varias proteínas de membrana externa que le permiten la adhesión a las células epiteliales gástricas y así coloniza el estómago (Posselt *et al.*, 2013).

Después de la colonización, se llevan a cabo una serie de procesos que se relacionan con el deterioro del epitelio gástrico que conducen al desarrollo de enfermedades gástricas, los cuales se relacionan con factores de virulencia bacterianos: CagA, VacA, BabA, SabA y OipA (Testerman *et al.*, 2014). Estas proteínas se han considerado especialmente relevantes porque las cepas que las producen se asocian a los casos de enfermedades gástricas graves, en particular al desarrollo de CG (Posselt *et al.*, 2013).



Figura 2. Micrografía de *H. pylori*

A pesar de que se desconoce la ruta de transmisión por la cual se adquiere *H. pylori* existen varios factores que propician la infección tales como el hacinamiento, medidas sanitarias inadecuadas, bajo nivel socioeconómico y la infección de algún miembro de la familia o persona del entorno, que pudiera facilitar la transmisión directa, por lo que se han propuesto las vías: oral-oral y fecal-oral (Peixoto *et al.*, 2016).

A pesar de que no se ha podido establecer la vía por la cual se adquiere *H. pylori*, se le ha asociado con enfermedades gástricas.

Enfermedades asociadas a *H. pylori*

H. pylori está etiológicamente asociada a enfermedades gástricas, sin embargo, la mayoría de las personas infectadas son asintomáticos, se estima que el 15% de las personas infectadas desarrollan síntomas de enfermedades gástricas tales como: Gastritis aguda y crónica, diferentes tipos de úlceras y de éstas el 2% aproximadamente, llegan a desarrollar cáncer gástrico (Sokic-Milutinovic *et al.*, 2015).

Infección aguda

La bacteria *H. pylori* penetra a través de la capa mucosa y se multiplica en células epiteliales superficiales, *H. pylori* coloniza primero el antro del estómago, debido a que no existen células parietales que secreten ácido, en esta fase inicial existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica intensa (Kuster *et al.*, 2006), que induce gastritis en todos los pacientes infectados, pero sólo entre el 10 al 15% sufren de síntomas clínicos (Díaz *et al.*, 2018).

Gastritis

Después de algunas semanas de la infección se desarrolla la gastritis, que se caracteriza por la inflamación de la mucosa gástrica. La gastritis crónica leve o moderada es muy frecuente en el conjunto de la población, sobre todo, en las personas de edad media o avanzada (Correa y Piazuolo, 2012).

La inflamación de la mucosa gástrica puede ser sólo superficial y, por tanto, poco nociva, o penetrar profundamente en la mucosa gástrica y provocar una atrofia casi completa de sus glándulas, si su evolución es prolongada, en algunos casos, la gastritis es aguda e intensa, con ulceraciones mucosas debido a la propia secreción del estómago (Cervantes-García, 2016).

Cuando la respuesta inflamatoria se reduce a niveles bajos, pasa a un estado asintomático, denominado gastritis crónica superficial. Aunque en el huésped activa la respuesta inmune ésta generalmente no es efectiva en la eliminación de *H. pylori* (Kuster *et al.*, 2006).

Gastritis crónica (GC)

Si *H. pylori* no es erradicada de la mucosa puede producir atrofia gástrica y pérdida de secreciones del estómago, la mucosa de pacientes con gastritis crónica se atrofia progresivamente hasta que la actividad glandular disminuye sustancialmente o desaparece por completo, lo que conduce a un adelgazamiento de su capa glandular y puede producir erosión o ulceración de la mucosa. La ausencia de secreciones en la atrofia gástrica lleva a la aclorhidria (hipoclorhidria), el estómago deja de secretar ácido clorhídrico (Correa y Piazuolo, 2012).

Metaplasia intestinal (MI)

La metaplasia intestinal, se considera como un factor de riesgo para la progresión a cáncer gástrico (Kinoshita *et al.*, 2017). Sin embargo, puede ser considerada como una estrategia defensiva contra *H. pylori*, ya que esta bacteria solo coloniza el epitelio gástrico. Consiste en un cambio potencialmente reversible cuando las glándulas originales y el epitelio foveolar son reemplazadas por células con fenotipo intestinal, que implica la adaptación a los estímulos ambientales.

Cáncer Gástrico (CG)

El cáncer se origina cuando las células en cualquier parte del cuerpo comienzan a crecer en forma descontrolada y pueden convertirse en cancerosas y extenderse a otras áreas, a esto se le conoce como metástasis (Díaz *et al.*, 2018).

El cáncer gástrico, se origina en el estómago; estos cánceres tienden a desarrollarse lentamente en un período de muchos años (Sokic-Milutinovic *et al.*, 2015).

La mayoría de los tumores del estómago son de origen epitelial (97%), se clasifican como adenocarcinomas. Una de las clasificaciones más populares es la de Lauren, que divide en adenocarcinoma gástrico en dos tipos histológicos: difuso e intestinal; este sistema describe los tumores por la descripción microscópica y los patrones de crecimiento (Lauren, 1965).

El adenocarcinoma gástrico de tipo difuso o indiferenciado, produce metástasis en estadios tempranos, se presenta por igual en toda la población, siendo más frecuente en poblaciones jóvenes a diferencia del intestinal, está más relacionado con factores genéticos. El adenocarcinoma de tipo intestinal es bien diferenciado, de crecimiento expansivo, tiene mayor relación con influencias de tipo ambiental para su desarrollo, y en hombres de mayor edad (Kim *et al.*, 2018).

Sin embargo, no todos los pacientes infectados desarrollan cáncer gástrico y esto se debe a diferentes factores tanto del hospedero, del ambiente y de la infección por *H. pylori*, además de que se han observado diferencias entre cepas bacterianas, factores de colonización y de virulencia que le permiten adaptarse al medio gástrico, causar un daño en las células epiteliales y por consiguiente desarrollar enfermedades gástricas (Sokic-Milutinovic *et al.*, 2015).

El punto culminante de la cascada de la carcinogénesis gástrica es la aparición de adenocarcinoma gástrico inicialmente in situ y luego invasor. La progresión se produce a lo largo de muchos años. En este modelo de Correa, la infección crónica por *H. pylori* ejerce un papel fundamental como disparador de la carcinogénesis (Figura 3) (Peleteiro et al, 2011).

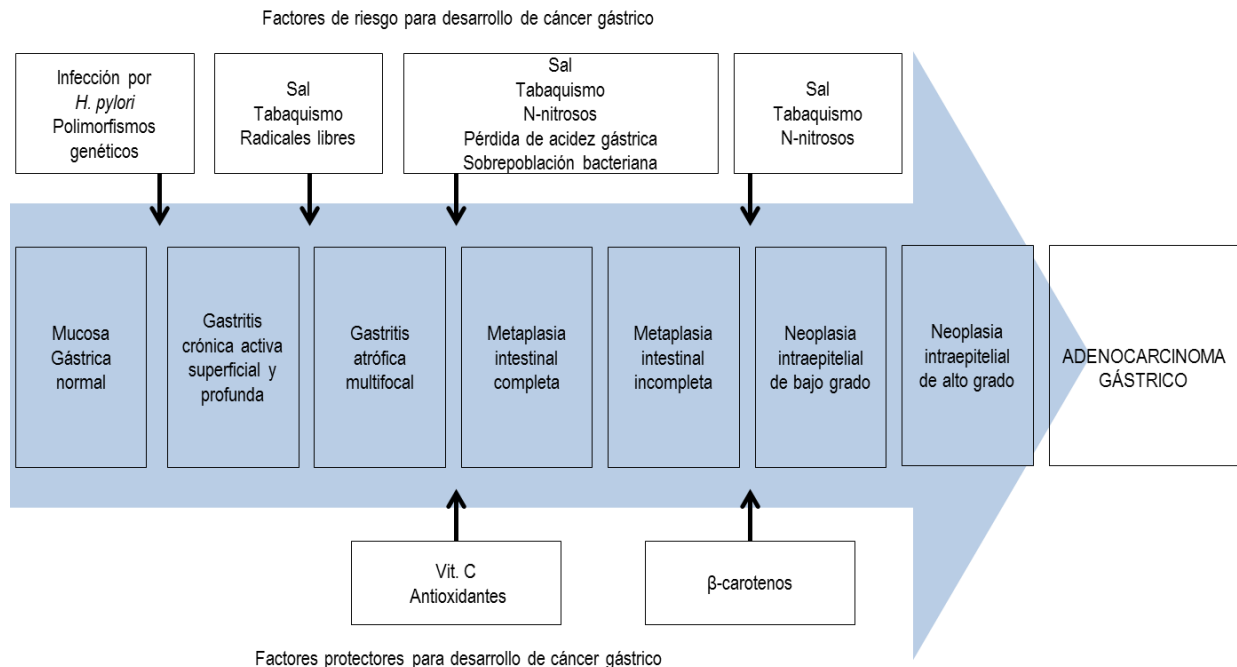


Figura 3. Modelo de carcinogénesis gástrica y factores de riesgo.

El 80% de los pacientes con cáncer gástrico son diagnosticados en etapas avanzadas, y la posibilidad de resección curativa es baja, con una supervivencia de 10 a 15% a cinco años, por lo que solo dos de cada diez enfermos sobreviven. El tratamiento exitoso del cáncer va íntimamente ligado a la oportunidad de detección, (Aldaco-sarvide *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando el diagnóstico se realiza en fases tardías, el tratamiento se focaliza en la atención paliativa, pues las posibilidades de curación son bajas y la probabilidad de diseminación de las células cancerígenas es mayor (Sitarz *et al.*, 2018).

Métodos para la detección de CG

El método de excelencia para el diagnóstico de cáncer es la endoscopia digestiva alta y biopsia gástrica. La endoscopía además de visualizar la lesión, determina su forma macroscópica, tamaño, localización y en ojos experimentados una estimación de la profundidad. Si el médico observa durante la realización de la endoscopia una lesión sospechosa, procederá a extraer una pequeña muestra de tejido de la zona, ésta deberá ser estudiada por un anatomopatólogo para poder emitir un diagnóstico confirmatorio o descartar la posible existencia de un cáncer, siendo candidato a cirugía (Leja *et al.*, 2014).

Estos métodos han tenido éxito, aunque se ha cuestionado la baja especificidad y costo-efectividad, además de ser un método invasivo. Es un proceso costoso porque requiere de un grupo de médicos y técnicos especializados y de equipos de alta tecnología (González y Rodríguez, 2011).

Los marcadores tumorales (MT) se comportan como indicadores o señales a distancia de la presencia de una neoplasia (Cruz *et al.*, 2008), ya que no existe una prueba sérica de laboratorio para la detección específica del cáncer gástrico, sin embargo, también se utilizan algunos marcadores tumorales, denominado como marcador biológico o biomarcador. Un biomarcador se define como una molécula, una sustancia o un proceso que se altera cualitativa o cuantitativamente como resultado de una condición precancerosa o un cáncer, cuya presencia puede ser detectada en el suero, plasma o en otros líquidos biológicos y que refleja un crecimiento o actividad tumoral permitiendo conocer la presencia, evolución o respuesta terapéutica de un tumor maligno.

Marcadores en el cáncer gástrico

No existe un marcador tumoral específico de cáncer gástrico, los más utilizados son el Antígeno carcinoembrionario (CEA), Antígeno de carbohidrato (CA 19.9) y Antígeno de Cáncer 72-4 (CA 72.4). De estos tres, el CA 72.4 se considera el más sensible, específico y es superior en cuanto a factor pronóstico (Cruz, *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguno de ellos demuestra tener utilidad en el cribado ni en un diagnóstico precoz. Algunos autores sugieren la utilización conjunta de dos marcadores con la finalidad de incrementar la sensibilidad diagnóstica. Una buena combinación sería la determinación conjunta de CEA y CA 72.413 (Ychou *et al.*, 2000 y Martínez *et al.*, 2016).

Es importante hacer énfasis en la necesidad de que los métodos de detección sean simples, efectivos y de bajo costo, especialmente para países económicamente débiles y con altas tasas de cáncer gástrico (Pinheiro *et al.*, 2014). La identificación de grupos de alto riesgo, por marcadores biológicos, podría disminuir el costo, elevando su efectividad en la detección de cáncer gástrico (Chao y Kun 2013).

Proteómica

Es un término introducido por primera vez por Wilkins en 1994 para referirse al conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma, en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas de tiempo y ambiente (Wilkins 1996).

El estudio del proteoma es una labor difícil debido al elevado número de proteínas existentes, aportando mayor información que el genoma sobre el estado fisiológico de un organismo, si tenemos en cuenta que son las proteínas, y no el ADN, las principales moléculas efectoras en las células, las que poseen funciones estructurales, enzimáticas, metabólicas, reguladoras y de señalización.

En el campo de la medicina se denomina proteómica clínica, a la aplicación de estas técnicas, y uno de sus principales objetivos es el descubrimiento de nuevos biomarcadores, es decir, características que se miden y evalúan objetivamente como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Asimismo, podrían servir para establecer el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, así como para determinar la eficacia del tratamiento farmacológico, siendo un biomarcador ideal aquel que se encuentra en una muestra biológica y puede obtenerse de forma no invasiva.

Con ayuda de la proteómica en los últimos años, se ha trabajado en la búsqueda de biomarcadores, para diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer gástrico.

Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas

En el Instituto Nacional de Salud Pública se desarrolló el proyecto “Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas premalignas y de transformación a cáncer por medio de electroforesis bi-dimensional y espectrometría de masas (LC-MS)” bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar. Su objetivo fue buscar biomarcadores asociados a lesiones premalignas y de transformación a cáncer,

utilizándose proteómica comparativa basada en la estrategia de la electroforesis diferencial de dos dimensiones DIGE (por sus siglas en inglés, Difference Gel Electrophoresis). Se analizaron diez muestras de plasma, 5 muestras de plasma de pacientes con cáncer gástrico (CG) y 5 muestras de plasma de pacientes con gastritis no atrófica (GCNA, que fueron los controles). Las imágenes 2D-DIGE generadas se analizaron estadísticamente utilizando el software DeCyder™ 2D. Fue posible detectar un grupo de 12 proteínas que mostraron una expresión diferencial, por un factor de 2 o más veces, entre los dos grupos. Siete de estas proteínas incrementaron su expresión en el grupo de cáncer gástrico, comparado con el control y cinco redujeron su expresión en el grupo de casos. La siguiente etapa comprendió la separación de las proteínas del plasma en geles preparativos de doble dimensión (24 cm x 24 cm), las manchas seleccionadas se cortaron manualmente y se identificaron con un MALDI-TOF-MS, con los espectros MS/MS obtenidos se realizó análisis bioinformático comparativo con el software Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), con un porcentaje de confianza del 66%.

Una vez realizado el análisis de los mapas proteicos y la identificación de las proteínas cuya expresión variaba entre las patologías maligna y benigna, se seleccionaron aquellas proteínas que por sus características podían ser consideradas potenciales candidatas a marcadores de CG. siendo: a) inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4 (ITIH4) b) proteína de unión a vitamina D (DBP), c) Clusterina (CLU).

Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4 (ITIH4)

La cadena pesada H4 (ITIH4) de inhibidor de la inter-alfa-tripsina es una glicoproteína sérica de 120 kDa secretada principalmente en hígado. ITIH4 es una de las cinco proteínas humanas de la cadena pesada del inhibidor de la alfa-tripsina (ITIH), una familia involucrada en la estabilidad de la matriz extracelular (MEC) (Piñeiro *et al.*, 2014).

ITIH4 circula en sangre humana a una concentración aproximadamente 100 µg/ml. es una proteína de fase aguda positiva regulada por IL-6 e implicada en el desarrollo y la regeneración del hígado, generando dos fragmentos, uno carboxilo terminal de 35 kDa y el otro de 85 kDa. El de 35 kDa, está O-glicosilado, permanece intacto mientras que el de 85 kDa se continúa fraccionando. Los fragmentos obtenidos de regiones ricas en prolina están asociados con diferentes condiciones de enfermedad y pueden aportar importante información diagnóstica (Salier *et al.*, 1996). El patrón de los fragmentos

puede ser útil como biomarcador potencial para detección y clasificación de cáncer. Se ha observado que en cáncer de ovario un péptido derivado de esta proteína se encontraba disminuido (Jayapalan *et al.*, 2013). Mientras que en suero de pacientes con cáncer de mama se reportaron niveles elevados de péptidos de ITIH4 (Van Den Broek *et al.*, 2010). De igual manera en muestras de orina de pacientes con cáncer de próstata en etapas tempranas se encontró en niveles elevados (Abdullah-Soheim *et al.*, 2010).

En cuanto a cáncer gástrico se observó que la proteína ITIH4 estaba sobre-expresada 2.2 veces en muestras de suero de pacientes con cáncer gástrico posteriormente se realizó la validación de esta proteína por la técnica de Monitoreo de Múltiples Reacciones (MRM) por sus siglas en inglés, confirmando su sobreexpresión con una $p=0.038$ en 7 de las 10 muestras de suero de cáncer gástrico analizadas (Subbnnayya *et al.*, 2015).

La proteína de unión a vitamina D (DBP)

La proteína de unión a vitamina D (DBP) (*Vitamin D Binding Protein*) es un α -globulina plasmática, de 458 aminoácidos (58 kDa) perteneciente a la misma familia que la albumina, y la afamina. En su estructura tridimensional se pueden diferenciar tres dominios: I, II y III; localizándose en el dominio I el sitio de unión a la vitamina D (White y Cooke 2000).

La DBP se sintetiza predominantemente en células parenquimáticas hepáticas. Sin embargo, una amplia variedad de otros tejidos produce DBP y se ha encontrado en distintos fluidos, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal, la saliva, leche materna y plasma (Marijn *et al.*, 2006).

El nombre de la DBP deriva de la función de unir y transportar los principales metabolitos de vitamina D, a los cuales se une con alta afinidad (85-88%); aunque también otras proteínas transportadoras no específicas o de baja afinidad (12-15%) como la albúmina pueden cumplir con esta función. La función primaria de la DBP parece ser el secuestro de los metabolitos de la vitamina D en sangre, proveyendo de esta manera una reserva estable de los mismos (25-hidroxivitamina D (25(OH) D, calcidiol), el principal metabolito circulante, y 1,25-dihidroxivitamina D (1,25 (OH)² D; calcitriol), el metabolito más activo de la vitamina D), ya que prolonga su vida media protegiéndolos de su rápida degradación metabólica (Du *et al.*, 2017). La DPB circula en el plasma 20 veces más alta que la

cantidad total de metabolitos de vitamina D. Su alta concentración, podría estar relacionada con otras de sus funciones.

Si bien DBP es la proteína especializada en el transporte de la vitamina D y sus metabolitos, se conocen además otras de sus funciones como es el transporte de ácidos grasos, la unión a la actina y la activación de macrófagos (White y Cooke 2000 y Delanghe *et al.*, 2015).

La DBP junto con la gelsolina actúa como un sistema eliminador de actina extracelular, la cual se libera en el entorno extracelular tras la lisis celular, sus condiciones iónicas promueven la polimerización de actina G (forma monómero) la actina F (forma microfilamentos). Los filamentos de actina poseen el potencial de bloquear y dañar la microvasculatura. El papel de la DBP en el sistema depurador de la actina es unir la actina G y evitar una mayor nucleación y polimerización. DBP no se une a actina F; más bien, la gelsolina puede unir y cortar los filamentos. Por tanto, la gelsolina desmonta los filamentos y DBP es capaz de estabilizar la actina en la forma monomérica de actina G (Delanghe *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que dos aminoácidos de esta cadena de proteínas son fuertemente asociados con la activación de los macrófagos. En algunas publicaciones, la proteína de unión a vitamina D muestra que puede responder a las enzimas liberadas por la inflamación y esto se refiere a menudo con MAF (factor activador de macrófagos) (Verboven C, *et al.* 2002). Los estudios demuestran que esta isoforma no solo activa los macrófagos, sino que ellos se apagan cuando ya no son necesarios, por lo que es un regulador del sistema inmune (Delanghe. *et al.*, 2015).

Varios estudios han investigado los niveles séricos de DBP asociados con el riesgo de cáncer. Se observó la sub-expresión de la proteína de DBP en muestras de plasma de pacientes con cáncer gástrico (Zeng *et al.*, 2007). Asimismo, se llevó a cabo la validación de la DBP como un nuevo biomarcador de cáncer gástrico confirmando su sub-expresión, esto por el método de ELISA (Humphries *et al.*, 2014).

Clusterina (CLU)

La proteína clusterina (CLU), fue identificada como un componente del fluido proveniente del testículo de ratas (Blaschuk 1983). De igual manera se describió en humanos, tras aislarla de células renales dañadas por glomerulonefritis membranosa (Murphy *et al.*, 1988). Clusterina ha sido aislada de diferentes tejidos (especialmente en cerebro, retina, hígado, glándulas suprarrenales, próstata,

testículos, riñón, pulmón y corazón) y en casi todos los fluidos fisiológicos (semen, leche materna, orina, líquido cefalorraquídeo y plasma), recibiendo varios sinónimos: proteína asociada al complemento SP40, apolipoproteína J, gp80, glicoproteína III, glicoproteína sulfatada 2, mensajero prostático represor de testosterona-2, proteína 8 inducida por radiación, proteína asociada a lipoproteína de alta densidad (Jones y Jomary 2002) . Asimismo, en 1995 se estableció por consenso la denominación de clusterina (Haddad, 1995).

La forma secretoria de clusterina es un heterodímero de 75-80 kDa. El mensajero maduro corresponde a una cadena polipeptídica primaria de 449 aminoácidos que contiene un péptido señal de 21 aminoácidos (Rosenberg *et al.*, 2002). El procesamiento proteolítico cliva la proteína en dos subunidades, generando una cadena α de 204-206 aminoácidos y una cadena β de 219-222 aminoácidos (Jones y Jomary 2002). Las dos cadenas se ensamblan en anti paralelo y sus centros, ricos en cisteína, se unen por cinco puentes disulfuro. En ambos lados de este núcleo central encontramos tres α -hélices anfipáticas y dos α -hélices enrolladas. Aproximadamente el 30% de la masa de la proteína madura está conformada por carbohidratos de estructura variable, que se unen a través de los seis puntos de N-glicosilación (Rohne *et al.*, 2016).

La función de CLU va a depender tanto del tipo celular o tejido donde se encuentre, como de los factores que regulan su expresión y localización dentro de la célula, así como de las circunstancias del entorno que le rodea (fisiológica o patológica); se ha visto involucrada en enfermedades neurodegenerativas, síndromes metabólicos, glomerulonefritis, patología cardiovascular y cáncer (Rohne *et al.*, 2016). Esta influencia tan extensa y variada, se debe a su capacidad para interactuar con una amplia variedad de moléculas: lípidos, proteínas amiloides, componentes del complejo de ataque de membrana, proteínas mal plegadas o quimioterápicos como el paclitaxel, entre otras. CLU es una proteína altamente conservada que interviene en multitud de procesos fisiopatológicos (Jones y Jomary 2002). Entre sus funciones fisiológicas destacan:

Chaperona extracelular: La primera función descrita para la CLU fue su actividad como chaperona extracelular que es independiente del ATP. Después de su secreción, CLU es capaz de identificar aquellas proteínas que no se han plegado correctamente, unirse a su superficie hidrofóbica y favorecer su eliminación: se internan en las células mediante endocitosis y posteriormente son degradadas en los lisosomas (Jones y Jomary 2002).

Capacidad de inhibir el sistema de complemento CLU circula normalmente en el plasma humano siendo capaz de inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana. La inhibición de la citólisis es mediada por la capacidad de la clusterina de interactuar con los sitios hidrofóbicos de anclaje en la membrana de los componentes C5b-7 (proteína de la vía lítica del sistema del complemento). En este sentido, se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de clusterina contiene un dominio estructural en la porción amino terminal apto para interactuar con segmentos hidrofóbicos (Rohne *et al.*, 2016). Igualmente, han sido detectados sitios de unión de alta afinidad entre clusterina y los componentes del complemento. Sin embargo, estas interacciones son inhibidas cuando C9 está polimerizado, lo que sugiere que solo las formas activadas de los componentes terminales del sistema de complemento exponen estos sitios de unión, evitando así, la unión de CLU a los componentes del complemento que circulan normalmente en el plasma (Jones y Jomary 2002).

La apoptosis CLU tiene una función citoprotectora, aparece como una respuesta no específica frente a una variedad de agregaciones a la célula que podría inducir a la apoptosis (quimioterapia citotóxica, radiación, exceso de radicales de oxígeno libre, carencia de estrógenos o andrógenos, etc.), situación que se ha observado en diversos estudios al comprobar que en la mayoría de las células normales CLU se detecta en bajas concentraciones, su expresión se incrementa bajo condiciones de estrés celular, aumentando su resistencia (Rohne *et al.*, 2016).

La forma citoplasmática de CLU es capaz de estabilizar complejos proteicos en el citoplasma, puede estabilizar la unión entre Ku70 y la proteína pro-apoptótica Bax (miembro de la familia Bcl-2), impidiendo su translocación con la membrana externa de la mitocondria y, por tanto, evita la activación de la cascada que inicia la apoptosis (Rohne *et al.*, 2016).

La síntesis de CLU se encuentra alterada en numerosos tipos de cáncer, observándose generalmente una sobreexpresión en la mayoría de los tumores, como pueden ser los de mama, próstata, laringe, vejiga, o pulmón. Sin embargo, los resultados no siempre han sido concluyentes, y algunos trabajos sugieren que CLU podría estar disminuida en ciertas neoplasias (Rohne *et al.*, 2016).

Se reportó la sub-expresión de CLU en cáncer gástrico (Lu *et al.*, 2007), identificando a la CLU sub-expresada 0.56 veces en muestras de plasma de cáncer gástrico sin embargo no realizó la validación (Uen *et al.*, 2013). Asimismo, se observó que la proteína CLU se encontraba sub-expresada en muestras de suero de pacientes con cáncer gástrico y en 2014 se llevó a cabo la validación de la

misma, donde utilizando la técnica de ELISA, se determinó la expresión de la proteína CLU en muestras de plasma de pacientes con cáncer gástrico respecto a sanos y corroboró que la proteína CLU estaba sub-expresada (Humphries *et al.*, 2014).

A pesar de las investigaciones llevadas a cabo, aún sigue siendo considerada una “proteína enigmática”, con funciones contradictorias en relación con la apoptosis celular, la tumorigenesis, y la progresión tumoral.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer gástrico es una de las neoplasias más comunes, siendo el cuarto tipo de cáncer en frecuencia y el segundo en cuanto a mortalidad por cáncer. El 90% de los tumores de estómago son malignos, el adenocarcinoma gástrico representa el 95% del total de neoplasias gástricas. Asimismo, existen proteínas antigénicas, como el Antígeno carcinoembrionario (CEA), Antígeno de carbohidrato (CA 19.9) y Antígeno de Cáncer 72-4 (CA 72.4), que sirven como biomarcadores para la detección y la evaluación pronóstica del CG, sin embargo, poseen baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del CG. Por tal motivo, la identificación de nuevas moléculas antigénicas con potencial para ser utilizadas en la detección en forma temprana CG es un área de oportunidad para el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico más sensibles, específicas y simultáneamente no invasivas.

HIPÓTESIS

Las muestras de plasma de pacientes con cáncer gástrico y gastritis crónica no atrófica, presentan diferencias en los niveles de expresión de las proteínas: Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4, proteína de unión a vitamina D y clusterina y se pudieran usar como biomarcadores de neoplasias malignas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre los niveles de expresión en plasma de las proteínas inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H4, proteína de unión a vitamina D y Clusterina, mediante inmunoblot en pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico, para investigar si pueden ser propuestas como biomarcadores de neoplasias gástricas malignas.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la frecuencia de las proteínas antigénicas DBP, CLU, ITIH4, en plasma de pacientes con GCNA y CG.
- 2) Evaluar los niveles de las proteínas DBP, CLU, ITIH4, en plasma de pacientes con GCNA y CG.
- 3) Determinar que proteína o proteínas pueden ser propuestas como biomarcadores de neoplasias malignas.

METODOLOGÍA

Población de estudio

La muestra biológica elegida para realizar el presente estudio fue plasma sanguíneo. Las muestras se obtuvieron de un grupo de pacientes que acudieron al servicio de Endoscopia del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) con indicación médica para la realización de endoscopia. Los pacientes que firmaron la carta de consentimiento informado aceptando participar en este estudio y cumplieron con los criterios de inclusión, se les aplicó un cuestionario basal a fin de obtener información respecto a su estilo de vida, alimentación y características socio-demográfica. Selección de muestras

Se seleccionaron las muestras de pacientes que cumplieron con los siguientes requisitos:

- Ser positivo a *Helicobacter pylori*.
- Tener un diagnóstico de gastritis crónica no atrófica o cáncer gástrico, del Instituto Nacional de Cancerología.

Métodos experimentales

Toma y manejo de muestras biológicas

Se tomaron 5mL de sangre periférica en tubos vacutainers con EDTA. La toma de la muestra fue realizada por personal de enfermería del INCAN.

Posterior a la obtención de muestras se procedió a separar el plasma de glóbulos rojos y glóbulos blancos, mediante una primera centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos a 25°C, obteniendo plasma rico en plaquetas. Para separar el plasma de las plaquetas se realizó una segunda centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenido el plasma purificado, se almacenó a -70°C hasta su uso.

Eliminación de albúmina e inmunoglobulinas

Se realizó mediante el kit comercial Albumin & IgG Depletion Spin Trap (GE Healthcare 28-9480-20). Este sistema hace uso de dos ligandos de inmutafinidad específicos, uno para inmunoglobulina G y otro para albúmina, dispuestos en perlas empacadas en columnas. Al pasar la muestra a través de la

columna estos ligandos interactúan con sus respectivas proteínas, reteniéndolas y permitiendo su separación de las demás proteínas de la muestra.

Siguiendo las indicaciones del proveedor, el proceso inició con la eliminación de la solución de almacenamiento y continuó con el lavado de la columna en dos porciones de 400 μ l de buffer de equilibrio (20 mM fosfato de sodio y 0.15M cloruro de sodio pH 7.4), después de cada lavado la columna se centrifugó a 800g por 30 segundos, a continuación 50 μ l de muestra de plasma se diluyeron en 50 μ l con buffer de equilibrio, se colocó el plasma diluido en la columna y se incubaron por 5 minutos a 25°C; al terminar este periodo las columnas se centrifugaron a 800g por 30 segundos. La suspensión obtenida se aplicó nuevamente en la columna, incubándose por otros 5 minutos se centrifugó a 800g por 30 segundos. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de buffer de equilibrio, se centrifugó nuevamente la columna y el eluido obtenido se unió con la fracción recogida en el paso anterior correspondiente a proteínas no retenidas. Esta fracción de plasma a la cual se le eliminó la albumina y las inmunoglobulinas se almacenó a -20°C.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante kit comercial 2D-Quant (GE Healthcare 80-6483-56), el cual está diseñado para la determinación precisa de la concentración de proteínas de cada una de las muestras. Este método de cuantificación se basa en la unión específica del ion cobre a la proteína, en donde solo el cobre libre remanente reacciona con el cromóforo, el cual da el color que absorbe luz en la región visible. La absorbancia de la muestra es inversamente proporcional a la concentración de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva estándar (0-25 μ g), usando como solución estándar 2 mg/ml de Albumina Sérica Bovina (BSA). Preparando seis concentraciones de BSA por duplicado como se indica en la siguiente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Preparación de curva estándar

Curva estándar						
Número de tubo	1	2	3	4	5	6
Concentración de BSA (μ g/ μ l)	0	5	10	15	20	25

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras plasma se tomaron 3 µl y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml (muestras por duplicado). Se agregaron a cada tubo 250 µl de solución precipitante, se agitaron e incubaron durante 2-3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 250 µl de solución co-precipitante, se centrifugaron 10,000 x g durante 5 minutos a 4°C, y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 50 µl de solución cobre y 200 µl de agua destilada.

Finalmente, se añadió 500 µl de solución colorimétrica y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Antes de transcurrido el tiempo se colocaron 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader, 168-1135). Con los resultados obtenidos en el equipo, se generó una curva estándar con las absorbancias de cada uno de los estándares contra la cantidad de proteínas, lo que permitió determinar la concentración de proteínas de cada muestra de plasma.

Gel de integridad

Para determinar la integridad de las proteínas en cada muestra que se utilizaría para el análisis de inmunoblot, se preparó un gel separador de poli(acrilamida) al 10% (2.5ml Tris-HCL pH 8.8 a 1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 3.3ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 4ml de Agua MilliQ) y el gel concentrador al 4% (2.5ml de Tris-HCL pH 6.8 a 1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 1.33ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 1.33mL de Agua MilliQ).

Una vez preparado el gel se cargaron 20 µg de proteína de cada muestra, a fin de observar la integridad de la muestra de proteínas antes de realizar los Western blot. El gel permitió visualizar si la cantidad de proteínas pipeteada en cada muestra fue homogénea, debido a la distribución de sus bandas y al patrón de migración de las muestras; el gel se corrió a 110 volts por 1:30 h, utilizando como buffer de corrida una solución de Tris-Base 25 mM, SDS 0.1%, glicina 192 mM y agua destilada.

Detección de anticuerpos mediante Western blot

Electroforesis en gel

Las proteínas del plasma se separaron utilizando la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida en presencia de SDS o SDS-PAGE, siguiendo el método discontinuo descrito por Laemmli, utilizando un gel separador de poliacrilamida al 10% (2.5ml Tris-HCL pH 8.8 a1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 3.3ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 4ml de Agua MilliQ) y el gel concentrador al 4% (2.5ml de Tris-HCL pH 6.8 a1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 1.33ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 1.33ml de Agua MilliQ). El gel se correrá a 110 volts por 1:30 h (Laemmli *et al.*, 1970).

Transferencia gel membrana

Una vez concluida la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF de 0.45 µm para la detección de proteínas de >10 kDa (*Immobilon-P*, Millipore) siguiendo el método descrito (Towbin *et al.*, 1979). La pieza de membrana, de tamaño similar al gel, previamente se activó en metanol 100% (V/V) durante 30 segundos, lo que permitió pasar del estado hidrofóbico a polar. Posteriormente se incubó durante 2 minutos en agua ultrapura, y finalmente se equilibró con una solución amortiguadora de transferencia (25mM de Tris-Base y 192mM de glicina, pH 8.3), con un 10% (V/V) de metanol, durante 30 segundos. Asimismo, la solución amortiguadora se emplearía para la transferencia, que se realizó durante 1:30 horas en el *Mini Trans-Blot* (Bio-rad), conectado a la fuente de alimentación. Puesto que la transferencia requiere del mantenimiento de una conductividad y temperatura uniformes a lo largo de toda la cubeta, fue necesario el uso de agitación en el interior del tanque. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con PBS-Tween al 0.05%.

Inmunodetección de proteínas

Una vez finalizada la transferencia de proteínas, se procedió a la inmunodetección de las diferentes proteínas de interés. La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada (Svelty) al 5% (p/v) en PBS pH 7.4, durante 1 hora en agitación y a 25 °C. A continuación, se incubó a 4°C, en agitación leve y durante 16 horas con el anticuerpo primario (las diluciones para cada proteína se indican en la **(Tabla 3)**).

Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario. Una vez transcurrido el tiempo se lavó la membrana con PBS-Tween al 0.05%.

Tabla 3. Anticuerpos comerciales.

Anticuerpo	Dilución para WB
Anti clusterin Policlonal Thermo PA5-20212	0.5-1 ug/ml
Anti proteína de unión a la vitamina D Policlonal Thermo PA5-19802	1 µg/ml
Anti ITIH4 policlonal Bioss bs-991412	1:100 – 1:1000

Todas diluciones se realizaron en solución 2.5% BSA/TBS-T

Análisis de imágenes

Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween durante 10 min y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Anti-Rabbit IgG) en una dilución 1:10,000 y se incubó durante 1 horas en agitación constante. Transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente tres veces con TBS/Tween y se procedió a revelar las bandas. Para ello se adicionó a cada membrana 200µl solución de inmunofijación para quimioluminiscencia SuperSignal® West Femto Maximun Sensity Substrate (Thermo Scientific). La detección se realizó empleando el densitómetro C-Dígit. Las imágenes individuales de las inmunotransferencias, se analizaron con el programa Image Studio Ver 5.2, se seleccionaron manualmente los campos de las imágenes de cada muestra; en la **Figura 4** se muestra un ejemplo del procesamiento realizado para cada una de las imágenes. La intensidad relativa de las bandas se determinó por medio de análisis densitométrico.

Una vez definida el área para cada imagen seleccionada se capturó la intensidad en pixeles y estos datos se pasaron al programa Excel, en donde se compararon los valores de intensidad entre los controles (GCNA) y los casos (CG).

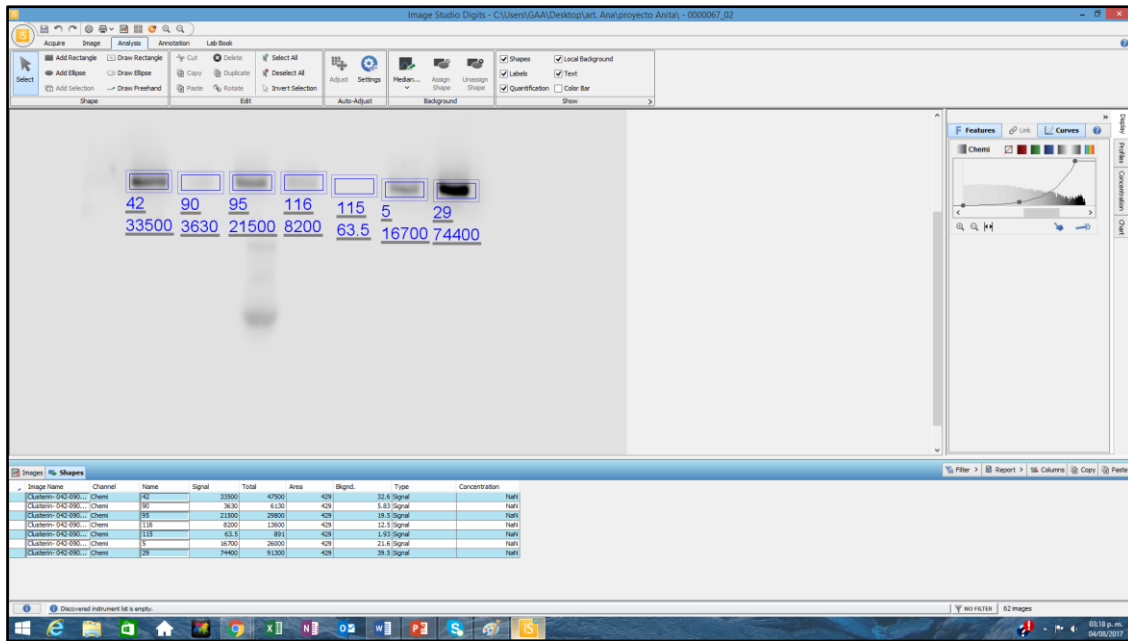


Figura 4. Captura de pantalla del análisis de las imágenes de Western blot

Adicionalmente, el programa permite la modificación de las imágenes en cuanto a contraste de color y brillo, esta modificación se realizó con el fin de mejorar la visualización, ya que no representa ningún cambio en la intensidad real de detectada por el equipo.

Análisis estadístico

Con el fin de determinar si existen diferencias en los niveles de expresión estadísticamente significativas, de cada proteína, entre la gastritis crónica no atrófica y el cáncer gástrico, se aplicó la prueba no paramétrica U Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron con el Software SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Science). Considerándose estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características generales de la población de estudio

Se captaron 124 pacientes, 54.9% (68/124) fueron del género femenino y 45.1% (56/124) del género masculino. El promedio de edad general fue de 54.9 años (intervalo: 24-87). El 17% (21/124) de la población estudiada tuvo un grado de escolaridad de licenciatura, el 49.5% (49/124) secundaria o bachillerato, 31.4% (39/124) con estudios de primaria y 12.1% (12/124) sin ningún estudio. El 39.5% (49/124) residían en la Ciudad de México y 60.5% (75/124) en otros estados. 49,1% (61/124) fumaban y el 50.9% (63/124) no fumaban (**Tabla 4**). En cuanto al consumo de alcohol 41.1% (51/124) consumían y el 58.9% (73/124) no consumían alcohol.

Tabla 4. Características generales de los 124 pacientes incluidos en el estudio.

Característica	n=124	%
Edad		
Media	54.9 (24-87)	
Genero		
Femenino	68	54.9
Masculino	56	45.1
Grado de escolaridad		
Licenciatura	21	17
Secundaria/bachillerato	49	49.55
Primaria	39	31.4
Ninguno	12	12.1
Lugar de residencia		
Distrito federal	49	39.5
Otros estados	75	60.5
Tabaquismo		
Si	61	49.1
No	63	50.9
Alcoholismo		
Si	51	41.1
No	73	58.9

Selección de muestras de plasma para el estudio de validación

Para este estudio se seleccionaron 40 muestras de plasma, de las cuales se formaron dos grupos de estudio de 20 muestras con diagnóstico histopatológico confirmatorio de gastritis crónica no atrófica (control) y 20 muestras de pacientes previamente diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo

intestinal (casos), ambos grupos fueron positivos a *H. pylori*, para ser incluidos en el estudio de validación.

Se determinó que para el grupo control fueron del género femenino 70% y del género masculino 30%, el promedio de edad general fue de 51.55 años. Para el grupo de los casos, que presentaron Adenocarcinoma tipo intestinal (ACI), de los cuales fueron 15% del género femenino y 75% del género masculino, el promedio de edad general fue de 58.9 años (**Tabla 5**).

Tabla 5. Grupo de pacientes seleccionados para la validación.

CARACTERÍSTICAS	GRUPO DE VALIDACIÓN (N=40)	
	Control, n (%) (n= 20)	Casos, n (%) (n= 20)
Edad (Años), Media ± SD	51.55 ± 14.44	58.9 ± 11.72
Genero		
Masculino	6 (30%)	15 (75%)
Femenino	14 (70%)	5 (15%)
Diagnostico histopatológico		
Adenocarcinoma tipo Intestinal (ACI)		20 (100%)
Gastritis Crónica (GC)	20 (100%)	

Verificación de la calidad de las muestras de plasma

Inicialmente se llevó a cabo la cuantificación de proteína de las muestras de plasma completa; para esto se realizaron diluciones de 1:50. Una curva representativa de calibración de la proteína estándar para la cuantificación con el método de Lowry se muestra en la **Figura 5**. Las concentraciones de las muestras de plasma se presentan en la **Tabla 6**.

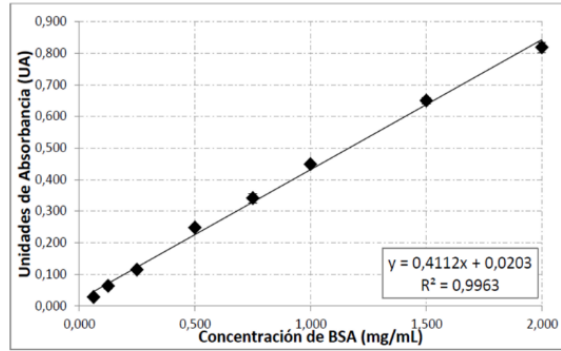


Figura 5. Curva de calibración obtenida por método de Lowry a 595nm.

Tabla 6. Concentración de proteína de las muestras originales incluidas en el estudio.

Muestras	Diluciones 1:50	Muestras originales
	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	2.01	100.31
2	1.59	79.50
3	1.75	87.19
4	1.46	73.19
5	1.67	83.60
6	1.92	95.84
7	1.76	87.79
8	1.58	78.96
9	1.97	98.61
10	1.79	89.42
11	1.72	85.89
12	1.62	80.93
13	2.38	119.10
14	1.71	85.64
15	1.79	89.60
16	2.08	104.01
17	1.61	80.39
18	1.84	92.00
19	1.48	73.89
20	1.60	79.85
21	1.41	70.31
22	1.53	76.46
23	1.68	84.05
24	2.74	136.92
25	1.37	68.59

Con el fin de realizar un control en la calidad de las proteínas presentes en las muestras seleccionadas se llevó a cabo una electroforesis unidimensional (**Figura 6**), en donde se exhibe que no existía degradación de proteínas que fueran causal de la pérdida de alguna de las ellas. En la figura se destaca la abundancia de las proteínas predominantes Albumina y las IgGs.

Las muestras colectadas se almacenaron a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ siempre, en las condiciones recomendadas para su conservación y se evitaron ciclos de congelación-descongelación para preservar la integridad de las proteínas al máximo.

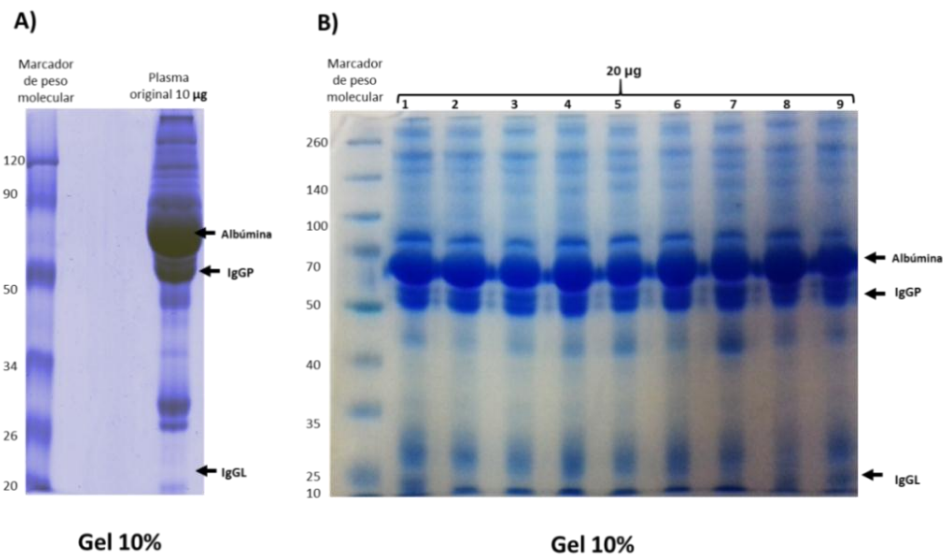


Figura 6. Perfil Electroforético de muestras de plasma. A) Muestra el perfil de 10 µg de plasma completo. B) Diferentes muestras de plasma diluidas (1:50) para cada muestra se colocaron 20 µg de proteína. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal.

Limpieza de las muestras de estudio y cuantificación de proteínas

Para la eliminación de albúmina e inmunoglobulina de las muestras de plasma, se utilizaron columnas de inmovilización específicas que retienen una buena proporción de albúmina e inmunoglobulinas. Una vez eliminada la albúmina e IgGs, las muestras se cuantificaron por el método 2D Quant (GE Healthcare) a 490 nm; la curva de calibración se muestra en la **Figura 7** y los resultados de la cuantificación se presentan en la **Tabla 7**.

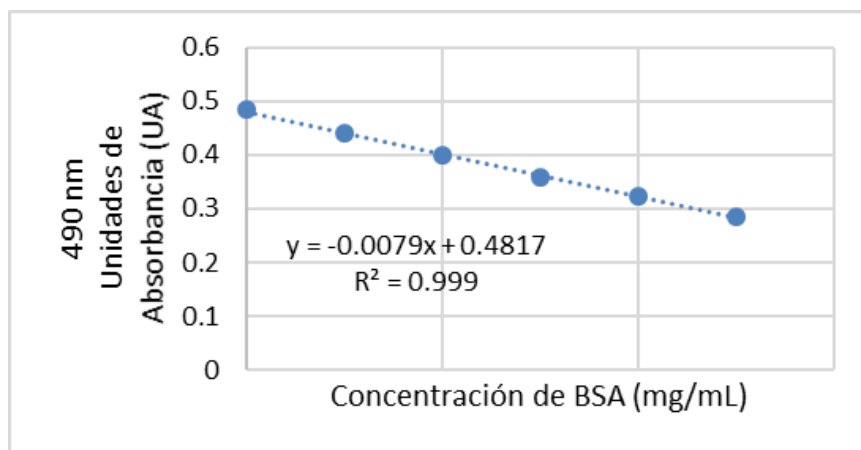


Figura 7. Curva de calibración de concentración BSA vs absorbancia, obtenida por 2D Quant (GE Healthcare) a 490 nm.

Tabla 7. Concentración de proteínas de plasma reducidas en BSA e IgGs que forman parte de las muestras incluidas en el estudio.

GASTRITIS CRÓNICA NO ATRÓFICA		CÁNCER GÁSTRICO	
MUESTRA	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	MUESTRA	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1	3.64	1	3.55
2	4.42	2	4.17
3	4.75	3	4.5
4	4.82	4	4.37
5	4.15	5	4.42
6	3.53	6	2.66
7	3.69	7	4.37
8	2.62	8	2.85
9	4.26	9	4.09
10	4.29	10	2.28
11	4.68	11	4.18
12	3.14	12	2.68
13	3.21	13	5.48
14	3.91	14	3.05
15	2.67	15	5.93
16	3.71	16	4.55
17	3.05	17	4.725
18	2.71	18	2.53
19	4.99	19	3.71
20	2.94	20	3.01
MEDIA \pm SD	3.75 \pm 0.76	MEDIA \pm SD	3.85 \pm 1.00

Gel de integridad

Las muestras reducidas en BSA e IgGs se analizaron por electroforesis unidimensional, con el fin de realizar un control en la calidad de las proteínas presentes (**Figura 8**). Los perfiles proteicos obtenidos mostraron ser evidentemente distintos entre sí, se aprecia que, aunque no se elimina completamente la albumina, ni la inmunoglobulina IgG, si se observa una disminución en la concentración de las mismas.

Es posible observar bandas definidas a lo largo de todos los carriles y un perfil uniforme para todas las muestras, sugiriendo que no existe degradación en las proteínas, siendo posible detectar otras proteínas, que no eran visibles en las muestras sin limpiar.

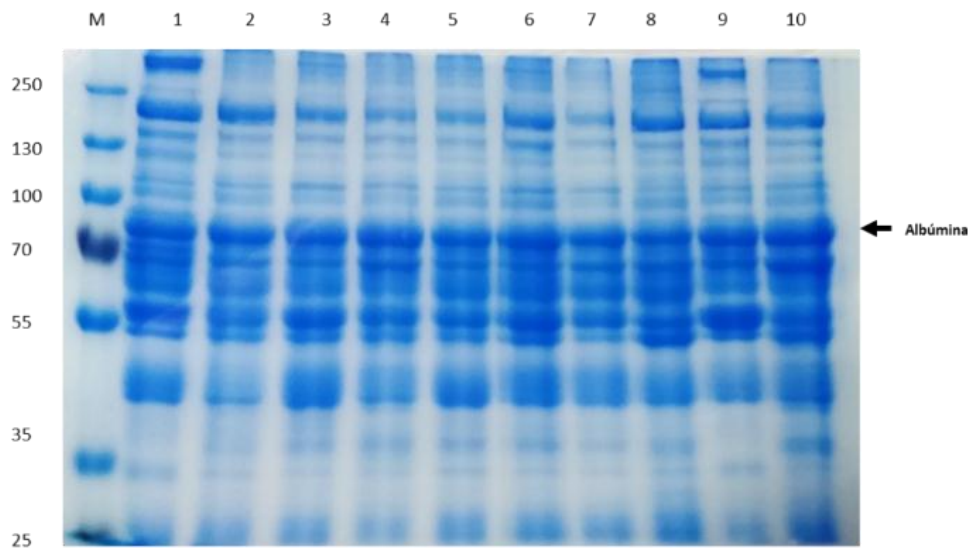


Figura 8. Perfil Electroforético de algunas muestras de plasma reducidas en BSA e IgGs, el gel se tiñó con azul de coomassie coloidal. M. Marcador de peso.1-10 (20µg de proteína de diferentes muestras de plasma).

En la actualidad, se han propuesto numerosos biomarcadores candidatos, principalmente mediante técnicas proteómicas, sin embargo, son datos muy preliminares y aún no se ha demostrado que poseen suficiente sensibilidad y especificidad para su uso en la práctica clínica. En este estudio validamos tres proteínas previamente identificadas por técnicas proteómicas, como posibles candidatos de biomarcadores capaces de distinguir entre gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.

Proteína ITIH4

Como se citó anteriormente (pag. 14), en el trabajo de 2D-DIGE se observó que la proteína ITIH4 se encontraba sobre-expresada en muestras de plasma de cáncer gástrico respecto a muestras control. Para poder comprobar si esta situación también se mantenía en un número mayor de muestras, se realizó la validación por Western blot.

Para la proteína ITIH4 (120 kDa) se realizaron inmunotransferencias de 37 muestras (19 de GCNA y 18 de CG) con el anticuerpo policlonal Anti ITIH4 Bioss bs-991412, los resultados se muestran en la **Figura 9**, cuando comparamos la intensidad de las bandas de casos respecto a los controles, no se observó un patrón definido (disminución o aumento) entre las bandas correspondientes a la GCNA y al CG, lo que sugiere una concentración de proteína similar para los dos grupos.

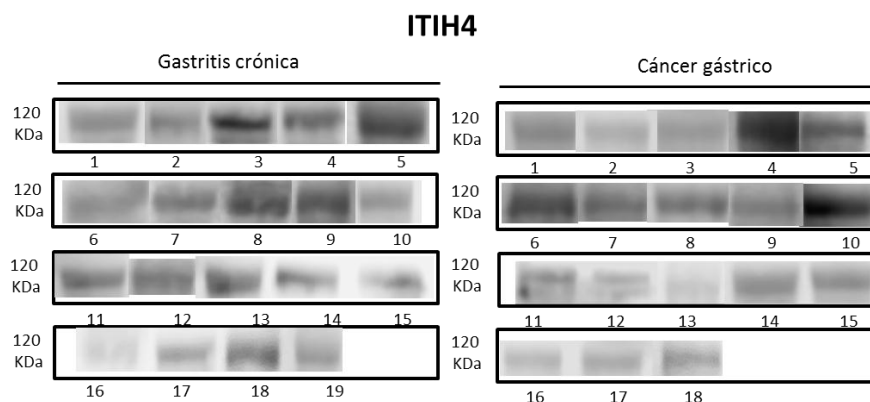


Figura 9. inmunotransferencia representativo de los niveles de ITIH4 en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica (control) y con cáncer gástrico (casos).

Para obtener una estimación semi-cuantitativa de los niveles de expresión para la proteína ITIH4 se realizó el análisis de las imágenes por densitometría y con los valores de intensidad obtenidos se realizó el análisis estadístico, para corroborar si existían diferencias en la expresión de la proteína ITIH4 entre los casos y los controles. Los valores densitométricos se muestran en la **Tabla 8**. Posteriormente utilizando el programa SPSS, se llevó a cabo la prueba no paramétrica de U Mann Whitney entre los dos grupos (casos-control), encontrándose que no existía diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($z = -0.562$, $p = 0.578$) (Figura 10).

Tabla 8. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de ITIH4 en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.

GASTRITIS CRÓNICA NO ATRÓFICA		CÁNCER GÁSTRICO	
MUESTRA	INTENSIDAD	MUESTRA	INTENSIDAD
1	3610	1	5410
2	5550	2	3770
3	17800	3	4400
4	6140	4	2190
5	6230	5	3780
6	2780	6	1590
7	2330	7	5680
8	2810	8	2330
9	1840	9	4140
10	2150	10	3530
11	711	11	4460
12	1910	12	4070
13	1400	13	2400
14	1770	14	5330
15	2600	15	3640
16	5510	16	1670
17	2380	17	7840
18	5820	18	3060
19	1900	-	-
MEDIANA	2600	MEDIANA	3775

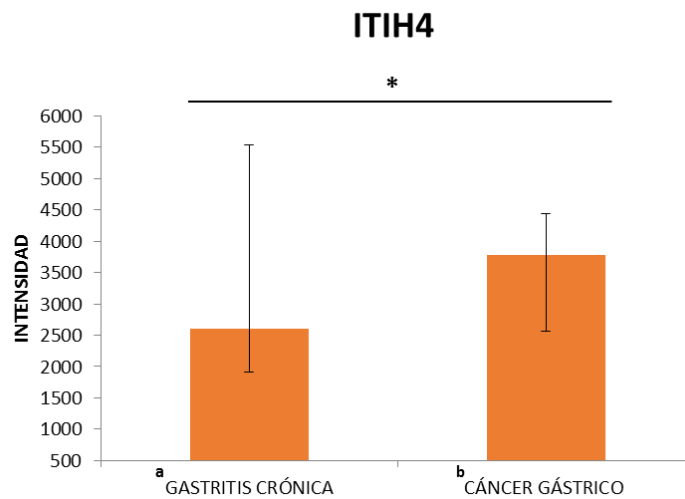


Figura 10. Nivel de expresión de la proteína ITIH4 entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico ($z=-0.562$, $*p=0.578$). ^aMediana [IIC], 2600 [1905-5530]. ^b Mediana [IIC], 3775 [2565-4445].

Los resultados previos por DIGE mostraban una sobre-expresión de ITIH4 en cáncer gástrico respecto a los controles, sin embargo, esas diferencias no fueron significativas y en este estudio al validar por Western Blot, con un mayor número de muestras, nuevamente no se observaron cambios significativos en la expresión de ITIH4 entre los casos y los controles.

La proteína inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4 (ITIH4) pertenece a la familia de la inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada (ITIH), se desconoce exactamente cuál es su función, es posible que puede estar involucrada en el transcurso de la fase aguda de las enfermedades, ha sido encontrada elevada en suero de pacientes que habían sido sometidos a cirugía, así como en diferentes procesos tumorales (Jayapalan *et al.*, 2013).

Proteína DBP

En relación con la proteína de unión a vitamina D (58 kDa) los resultados de 2D-DIGE mostraron que su expresión estaba disminuida en plasma de pacientes con cáncer gástrico respecto al control. En consideración que en el análisis del 2D-DIGE se utilizaron pocas muestras. A fin de confirmar si esta situación se mantenía se utilizó un número mayor de muestras, que fueron analizadas por Western Blot para validar la expresión de la proteína DBP.

Las inmunotransferencias se realizaron en 40 muestras (20 de GCNA y 20 de CG) con el anticuerpo policlonal antiproteína de unión a la vitamina D Thermo PA5-19802, se muestran en la **Figura 11**. En el caso de los pacientes con gastritis crónica no atrófica se observa un patrón de señal uniforme para las 20 muestras, de igual forma, en las muestras de CG se observó un patrón de señal de menor intensidad respecto al de GCNA, lo que sugiere una menor expresión de la proteína.

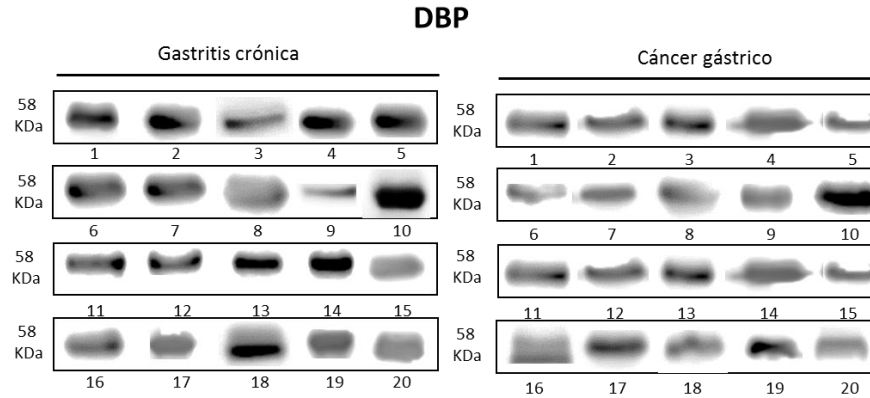


Figura 11. Inmunotransferencia representativa de los niveles de DBP en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica y con cáncer gástrico.

Además, se realizó el análisis de las imágenes por densitometría y posterior análisis estadístico para corroborar si las diferencias observadas en la expresión de la proteína DBP entre el plasma de los casos y plasma de los controles, eran significativos. En la **Tabla 9** se muestran los valores de intensidad obtenidos por densitometría de casos y controles con los cuales se llevó a cabo la prueba no paramétrica de U Mann Whitney utilizando el programa SPSS entre los dos grupos (casos-control).

En concordancia con los resultados obtenidos previamente en el experimento 2D-DIGE para la proteína DBP, se observa una menor intensidad de señal (que refleja una menor expresión) en muestras de pacientes con cáncer gástrico respecto al control, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($z=-2.543$, $*p=0.068$) (**Figura 12**). Se tendría que considerar que la muestra utilizada hay un mayor número de mujeres en grupo de controles, mientras que en los casos la mayoría son hombres. Por lo que sería recomendable explorar los cambios de expresión de esta proteína en una muestra más equilibrada en cuanto al género y con una muestra de mayor tamaño.

Tabla 9. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de DBP en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.

GASTRITIS CRÓNICA NO ATRÓFICA		CÁNCER GÁSTRICO	
MUESTRA	INTENSIDAD	MUESTRA	INTENSIDAD
1	340000	1	699500
2	491500	2	490500
3	965500	3	381500
4	408000	4	280000
5	627000	5	182000
6	483000	6	126000
7	425000	7	185500
8	374000	8	374500
9	346400	9	647000
10	924000	10	316000
11	664000	11	496000
12	83600	12	270000
13	739000	13	179000
14	783000	14	172150
15	107000	15	104050
16	213000	16	280500
17	830000	17	452000
18	978000	18	527000
19	478500	19	447500
20	153000	20	395500
MEDIANA	480750	MEDIANA	345250

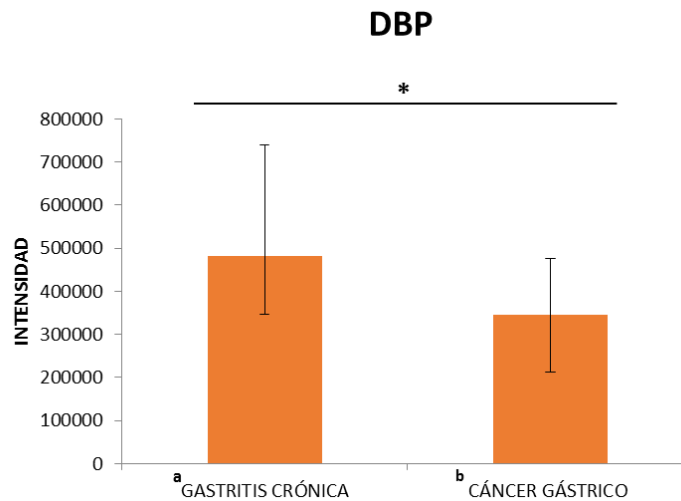


Figura 12 Nivel de expresión de la proteína DBP entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico ($z=-1.83$, $*p=0.068$). ^aMediana [IIC], 480750 [344800-750000]. ^bMediana [IIC], 345250 [184625-461625].

Proteína CLU

En relación con la proteína Clusterina (75-80 kDa) los resultados de 2D-DIGE mostraron que la expresión de la proteína CLU estaba disminuida en plasma de pacientes con cáncer gástrico respecto al control, para que sea posible confirmar si esta situación se daba en un número mayor de muestras, se realizó la validación por Western blot.

Las inmunotransferencias se realizaron en 40 muestras (20 de GCNA y 20 de CG) con el anticuerpo policlonal Anti Clusterin Policlonal Thermo PA5-20212. Las imágenes obtenidas se muestran en la **Figura 13**, se observó un cambio en el patrón de señal; en el caso de pacientes con gastritis crónica no atrófica se distinguen dos grupos, uno donde la concentración de proteína es baja y en el otro se encuentra en mayor proporción. Para el caso del grupo de cáncer gástrico se observó que la mayoría mostraron una intensidad baja, sugiriendo que la concentración de esta proteína es menor en los casos que en controles.

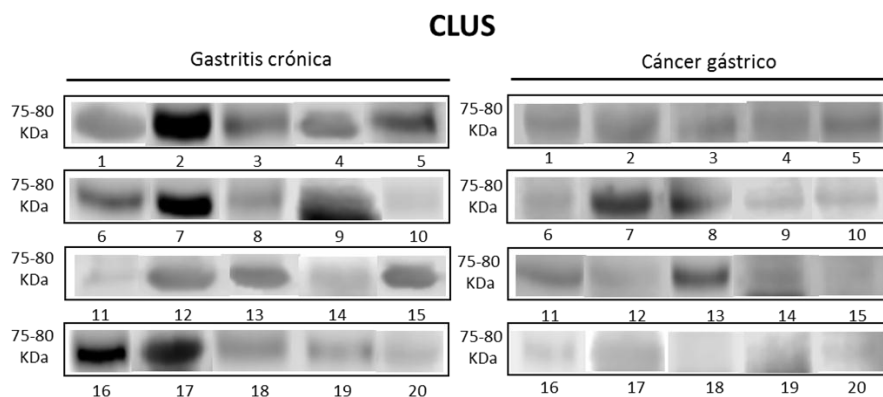


Figura 13. Inmunotransferencias representativas de los niveles de CLU en plasmas de pacientes con gastritis crónica no atrófica (control) y con cáncer gástrico (casos).

El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas por Western blot, se muestra en la **Tabla 10**. Posteriormente utilizando el programa SPSS, se llevó a cabo la prueba de U Mann, mostró que en concordancia con los resultados obtenidos previamente en el experimento 2D-DIGE para la proteína CLU, se observa una menor intensidad de señal (que refleja una menor expresión de la proteína) en muestras de pacientes con cáncer gástrico en comparación con las muestras de plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($z = -2.543$, $*p = 0.010$) (**Figura 14**).

Tabla 10. Valores de intensidad promedio de las réplicas para los niveles de CLU en plasma de pacientes con gastritis crónica no atrófica y cáncer gástrico.

GASTRITIS CRÓNICA NO ATRÓFICA		CÁNCER GÁSTRICO	
MUESTRA	INTENSIDAD	MUESTRA	INTENSIDAD
1	9400	1	13150
2	40180	2	3100
3	1675	3	740
4	57650	4	1340
5	31705	5	3320
6	8880	6	6091
7	49133	7	1185
8	2640	8	10785
9	43400	9	14105
10	43500	10	20120
11	69500	11	13025
12	35700	12	9350
13	32350	13	55000
14	3860	14	2962
15	23000	15	56750
16	24800	16	48050
17	78500	17	2250
18	13300	18	241.95
19	9330	19	3600
20	6410	20	2200
MEDIANA	28252.5	MEDIANA	4845.25

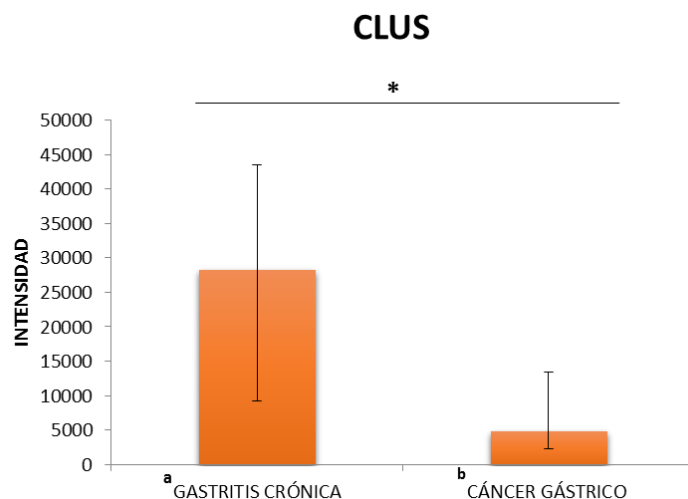


Figura 14. Nivel de expresión de la proteína CLU entre Gastritis Crónica no atrófica y Cáncer Gástrico ($z=-2.543$, $*p=0.010$). aMediana [IIC], 28252.5 [9217.5-43425]. bMediana [IIC], 4845.25 [2237.5-13388.75].

Los resultados previos por 2D-DIGE mostraban una disminución de la proteína CLU en cáncer gástrico respecto a los controles, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, al validar por Wester Blot con un mayor número de muestras se confirmó una reducción significativa en la expresión de la proteína CLU entre los casos con respecto a los controles (Medianas 4845.25 vs 28252.5)

En un trabajo realizado en pacientes con cáncer de mama se observó que la expresión de CLU está correlacionada con el tamaño del tumor y de esta manera también se asocia con el estado negativo de los receptores de estrógenos y progesterona, este grupo concluyó que la expresión de CLU medida por inmunohistoquímica se correlaciona positivamente con la progresión del carcinoma primario hasta la metástasis en los nódulos linfáticos (Redondo *et al.*, 2000). En el 2015 el grupo de Bertuzzi *et al.*, encontró sobre-expresada la proteína CLU en plasma, identifico a la proteína CLU como un biomarcador temprano de cáncer colorrectal estos datos fueron significativos solo para el grupo de hombres, cabe señalar que el tamaño de muestra fue de 56 pacientes (Media \pm SD, 1.98 ± 0.46 and 1.61 ± 0.43 nmol/mL respectivamente. Recientemente se reportó la sobre-expresión de clusterina en biopsias de estómago en pacientes con cáncer gástrico mediante el marcaje el isobárico (iTRAQ) y LC-MS/MS (Fernández *et al.*, 2018). Humphries reportó una disminución significativa de clusterina en suero de pacientes con cáncer gástrico en comparación al grupo control. (Humphries *et al.*, 2014). De manera similar en las muestras de plasma analizadas en este trabajo encontramos que el nivel de expresión de la proteína CLU disminuía en las muestras de cáncer gástrico con respecto al control. Esta disparidad se podría explicar por diferencias en el tipo de muestra; mientras que en los trabajos

mencionados antes se evaluó la expresión de clusterina en muestras de tejido, en este trabajo evaluamos la expresión de clusterina en plasma. Por lo que podemos proponer que, dado que la CLU está relacionada con la progresión del carcinoma, la proteína se retiene en el interior de la célula y de alguna manera se bloquea su salida y por esta razón disminuye su concentración en el plasma.

CONCLUSIÓN

Las diferencias en los niveles de expresión de cada una de estas proteínas en las muestras de plasma de casos y controles se validaron en este estudio por medio de Western Blot. Para la proteína ITIH4 por 2D-DIGE se observó mayor expresión en el grupo de pacientes con cáncer gástrico, de igual manera mediante Western blot al utilizar un mayor número muestras se observó el mismo patrón, sin embargo, la diferencia no fue significativa. En cuanto a la proteína DBP por 2D-DIGE se observó una expresión menor en el grupo de pacientes con cáncer gástrico en concordancia con lo encontrado mediante Western Blot mostrando una diferencia marginalmente significativa, la cual consideramos podría mejorarse incrementando el tamaño de muestra. En el caso de la proteína Clusterina que mostró un nivel de expresión menor que el grupo de pacientes con cáncer gástrico por el análisis proteómico, en correspondencia con lo observado por Western Blot se observó una concentración significativamente menor de la proteína Clusterina en muestras de plasma de pacientes con cáncer gástrico que en el grupo control.

Por los resultados obtenidos en este estudio y los reportados previamente por otros investigadores, se propone a la proteína Clusterina como un posible biomarcador para el diagnóstico diferencial y no invasivo del cáncer gástrico. La validación mediante técnicas sencillas y no invasivas, como las utilizadas en este estudio, podrían ayudar a los oncólogos a confirmar el diagnóstico, dada la dificultad en cuanto al acceso de una endoscopia para el diagnóstico del cáncer gástrico

PERSPECTIVAS

No obstante, los resultados de esta tesis son todavía preliminares, por lo que se considera de gran interés que las proteínas aquí descritas, sean evaluadas en bioensayos de laboratorio en un mayor número de pacientes y quizás en el futuro, sean utilizadas en la práctica clínica.

LITERATURA CITADA

Abdullah-soheimi, S. S., Lim, B., Hashim, O. H., & Shuib, A. S. (2010). Patients with ovarian carcinoma excrete different altered levels of urine CD59, kininogen-1 and fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and albumin. *Proteome Science*, 8(1), 58.

Aldaco-sarvide, F., Pérez-pérez, P., Cervantes-sánchez, G., Torrecillas-torres, L., & Cárdenas-cárdenas, R. E. (2018). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17, 28–34.

Atkinson A.J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89-95.

Bertuzzi M, Marelli C, Bagnati R, Colombi A, Fanelli R, Saieva C, et al. Plasma clusterin as a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition : a pilot study. *BMC Cancer*. 2015;15:56.

Blaschuk, O., Burdzy, K. & Fritz, I. B. (1983). Purification and characterization of a cell- aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 7714–7720.

Burkitt, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M., & Pritchard, D. M. (2017). *Helicobacter pylori* -induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models. *Disease Models & Mechanisms*, 10(2), 89–104.

Cervantes-García, E. (2016). *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Rev Latinoam Patol Clin Med LAb*, 63(2), 100–109.

Chao-Zhu, H. y Kun-He, Z. (2013). Serum Protein and Genetic Tumor Markers of Gastric Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14 (6), 3437-3442.

Du, C., Yang, S., Zhao, X., & Dong, H. (2017). Pathogenic roles of alterations in vitamin D and vitamin D receptor in gastric tumorigenesis. *Oncotarget*, 8(17), 29474–29486.

Correa, P., & Piazzuelo, M. B. (2012). The gastric precancerous cascade. *Journal of Digestive Diseases*, 13(1), 2–9.

Cruz, P., Villegas, V., y Ramírez, S. (2008) Biological basis and clinical application of serum tumor markers. *Ciencias de la Salud*, 6(2), 85-98.

Delanghe, J. R., & Speeckaert, R. (2015). Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Behind the scenes of vitamin D binding protein: More than vitamin D binding. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(5), 773–786.

Díaz, P., Valderrama, M. V., & Bravo, J. (2018). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Frontiers in Microbiology*, 9(1), 1–10.

Du, C., Yang, S., Zhao, X., & Dong, H. (2017). Pathogenic roles of alterations in vitamin D and vitamin D receptor in gastric tumorigenesis. *Oncotarget*, 8(17), 29474–29486.

Fernández-Coto, D. L., Gil, J., Hernández, A., Herrera-Goepfert, R., Castro-Romero, I., Hernández-Márquez, E. & Ayala, G. (2018). Quantitative proteomics reveals proteins involved in the progression from non-cancerous lesions to gastric cancer. *Journal of Proteomics*, 186, 15–27.

González L., L., & Rodríguez G., B. (2011). Pathogenesis of Infection due to *Helicobacter Pylori*. *Cubana de Medicina* 50(4), 441–452.

GLOBOCAN (2012). Estimated cáncer incidence, mortality and prevalence. Worldwide. International Agency for Research Cancer. World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx.

Gramsch H. I., & Tan P. (2013). Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Dig Surg* 30:150-8.

Haddad J. G. (1995). Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): Multiple tasks. *Steroid Biochem Mol Biol* 53: 579-582.

Hamad S. H. (2015). Environmental Factors Controlling Gastric Cancer. *Management of Gastric Cancer*. 1-15. (ISBN:979-1-944685-75-1).

Hanazono K., Natsugoe S., & Stein H.J. (2006). Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression. *Oncol Rep*, 15:821-4.

Humphries, J. M., Penno, M. A., Weiland, F., Klingler-Hoffmann, M., Zuber, A., & Boussioutas, A., Hoffmann, P. (2014). Identification and validation of novel candidate protein biomarkers for the detection of human gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 18.44(5), 1051–1058.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Causas de mortalidad, 2015. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/Defalut.aprox't-moderno107&estatic-23587>.

Jayapalan J.J., Shuib A.S., & Razack, H. O., (2013). Urine of patients with early prostate cancer contains lower levels of light chain fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor and saposin B but increased expression of an inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 fragment. *Electrophoresis*, 34(11), 1663–1669.

Jones, S. E., & Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(5), 427–431.

Karimi P., Islami F. & Anandasabapathy S. (2014). Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:700-713.

Kim, S. M., Min, B., Lee, J., An, J. Y., Lee, J. H., Sohn, T. S., & Choi, M. (2018). Protective Effects of Female Reproductive Factors on Lauren Intestinal-Type Gastric Adenocarcinoma. *Yonsei Medical*, 59(1), 28–34.

Kinoshita, H., & Hayakawa, Y. (2017). Metaplasia in the Stomach — Precursor of Gastric Cancer. *Molecular Sciences*, 18, 1–16.

Kusters, J. G., Van-Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.

Lauren P. (1965). The Two Histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called Intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. *Acta Patho Microbiol Scand*, 64(31) 49.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lee Y. Y., & Derakhshan M. H. (2013). Environmental and Lifestyle Risk Factors of Gastric Cancer. *Archives of Iranian Medicine*, 16: 358-365.

Leja, M., You, W., Camargo, M. C., & Saito, H. (2014). Implementation of gastric cancer screening - The global experience. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 28(6), 1093–1106.

Liu W., Liu B., Xin L., Zhang Y., Chen X., Zhu Z., & Lin Y. (2007) Down-regulated expression of complement factor I: a potential suppressive protein for gastric cancer identified by serum proteome analysis. *Clin. Chim. Acta.* 377 (1–2), pp. 119-126.

Marijn S., Guangming H., Joris R., & Delanghe Y. (2006) Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. Elsevier.

Martínez, P. T., & Colomer B. R. (2016). Biomarcadores moleculares y genómica en el cáncer de mama. *Instituto Roche-Oncobyg*, 1–36.

Mbulaiteye S. M., Hisada M., & El-Omar E. M. (2010). *Helicobacter pylori* associated global gastric cancer burden. *Front Biosci.* 14: 1490-1504.

Murphy, B. F., Kirszbaum, L., Walker, I. D. & d'Apice, A. J. (1988). A newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *The Journal of clinical investigation* 81, 1858-1864.

Peleteiro B., Lunet N. (2011). Role of Genetic and Environmental Risk Factors in Gastric Carcinogenesis Pathway. En: Tonino P editor. Gastritis and Gastric Cancer. New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments. InTech; DOI 10.5772/23662. (ISBN:978-953-307-375-0).

Peixoto, A., Silva, M., Gaspar, R., Morais, R., Ramalho, R., Macedo, G., & Santos-Antunes, J. (2016). Loose ends in the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Translational Internal Medicine*, 4(4), 178–181.

Perry A. F., Dallon E. S. & Lund J. (2012). Burden of Gastrointestinal disease in the United States: 2012 Update. *Gastroenterology*.143:1179-87.

Pinheiro D. R., Ferreira W. A., Barros M. B., Araújo M. D., Rodrigues-Antunes S., & Borges B. N. (2014) Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: Diagnostic and prognostic applications. *World Journal of Gastroenterology*.: WJG, 20(33), 11574–11585.

Piñeiro, M., Andrés, M., Iturralde, M., Carmona, S., Hirvonen, J., Pyörälä, S., & Alava, M. A. (2004). ITIH4 (Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4) Is a New Acute-Phase Protein Isolated from Cattle during Experimental Infection. *Infection and Immunity*, 72(7), 3777–3782.

Posselt, G., Backert, S., & Wessler, S. (2013). The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1.

Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petto CK. (2000). Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Patol*, 157(2):393-399.

Rohne, P., Prochnow, H., & Koch-brandt, C. (2016). The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomolecular Concepts*, 7(1), 205–214.

Rosenberg M. E., Girton R., Finkel D., Chmielewski D., Barrie A., Witte D. P., Zhu G., Bissler J.J. & Harmony J. A. (2002). Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Mol Cell Biol* 2002; 22, 22, 1893–1902.

Salier, J., Rouet, P., Raguenez, G., & Daveau, M. (1996). The inter- α -inhibitor family : from structure to regulation. *Biochem J*, 9, 1–9.

Sánchez-Barriga, J. J. (2016). Mortality trends and years of potential life lost from gastric cancer in Mexico, 2000-2012. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 81(2), 65–73.

Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., & Polkowski, W. P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research*, 10, 239–248.

Sokic-Milutinovic, A., Alempijevic, T., & Milosavljevic, T. (2015). Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis: Current knowledge and future directions. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11654–11672.

Subbannayya, Y., Mir, S. A., Renuse, S., Srikanth, S., Pinto, S. M., Puttamalles, V. N., & Vidyapeetham, A. V. (2015). Identification of differentially expressed serum proteins in gastric adenocarcinoma. *Proteomics*, 127(0 0), 80–88.

Testerman T. L. & Morris J. (2014). Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* ; 20: 12781-12808.

Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 76:4350-4354.

Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S. & Yamakido, M. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The New England Journal of Medicine*. 345(11); 784-789.

Uen, Y. H., Lin, K. Y., Sun, D. P., Liao, C. C., Hsieh, M. S., Huang, Y. K., & Lin, C. Y. (2013). Comparative proteomics, network analysis and post-translational modification identification reveal differential profiles of plasma Con A-bound glycoprotein biomarkers in gastric cancer. *Journal of Proteomics*, 83(250), 197–213.

Van Den Broek, I., Sparidans, R. W., Van Winden, A. W. J., Gast, M. C. W., Van Dulken, E. J., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2010). The absolute quantification of eight inter-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4)-derived peptides in serum from breast cancer patients. *Proteomics - Clinical Applications*, 4(12), 931–939.

Verboven C., Rabijns A., De Maeyer M., Van Baelen H., Bouillon R., & De Ranter C. (2002). A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol*. 9(2):131-6.

Wang K., Yuen S. T., Ju J. (2014). Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*; 46:573-82.

White, P., & Cooke, N. (2000). The Multifunctional Properties and Characteristics of Vitamin D-binding Protein. *Elsevier Science*, 11(8), 320–327.

Wilkins M. R., Pasqual C., Appel R. D., Ou K., Golaz O. & Sanchez J. C.(1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol Nat Pub* (14):61-65.

World Cancer Research Fund International / American Institute for Cancer Research. (2016). Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Stomach Cancer. wcrf.org/stomach-cancer-2016.

Ychou, M., Duffour, J., Kramar, A., Gourgou, S., & Grenier, J. (2000). Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Disease markers*, 16(3-4), 105-110.