



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Análisis proteómico de células de colon humano  
antes y después de la interacción con  
*Lactobacillus casei* Shirota**

Tesis que presenta  
**Lizeth García Torres**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**  
**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

San Luis Potosí, S.L.P., 20 de febrero de 2015



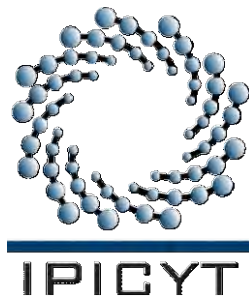
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis *“Análisis proteómico de células de colon humano antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota”* presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Lizeth García Torres y aprobada el **veinte de febrero del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Directora de la tesis

**Dra. María de Lourdes Reyes Escogido**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Antonio De León Rodríguez**  
Miembro del Comité Tutorial



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 279195) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

A Fondo Sectorial SEP-CONACyT S-3180. Estudio Proteómico De La Interacción De *Bifidobacterium Longum* Con Células De Colon Humanas.

A CONACYT-MEXICO proyecto 56787 (Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología-LINAN), INFRA-2013-01 proyecto 204373



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 128 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de febrero del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Reyes Escogido</b>	<b>Secretaria</b>	<b>UGTO</b>
<b>Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Lizeth García Torres**

sobre la Tesis intitulada:

*Análisis proteómico de células de colon humano antes y después de la interacción con Lactobacillus casei Shirota*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de febrero de 2015.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Mann**  
Secretario Académico



## **Dedicatoria**

A mis padres, por su amor y por estar siempre a mi lado. Gracias mamá por motivarme a seguir adelante. Gracias papá por darme el impulso a dar un nuevo paso.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (279195) otorgada.

A los Mexicanos, por sus impuestos que fueron utilizados para el apoyo económico.

A la Dra. Ana paulina Barba de la Rosa por darme la gran oportunidad de trabajar y aprender dentro de su laboratorio.

A Alberto Barrera Pacheco por el apoyo técnico, consejos y amistad. A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Proteómica y Biomedicina molecular, por volverse otra familia para mí. Y a Antonio Castellanos (CNS-IPICyT) por su valiosa ayuda.

A Julia y a Jimena, por su amistad, sus consejos, enseñanzas, por todas las risas.

A mi familia, por su apoyo en todos los momentos difíciles y en las alegrías también. Gracias por estar siempre para mí.

A todos mis compañeros y amigos de generación, son los mejores que pude haber tenido.

A los que creyeron y a los que no creyeron en mí, por impulsarme a seguir.

A Dios, por darme paciencia y serenidad para continuar y darme fe para creer en mí, por no dejarme sola en ningún momento.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Constancia de aprobación de tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Acta de examen</b>	iv
<b>Dedicatoria</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Resumen</b>	xi
<b>Abstract</b>	xii

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Alimentos funcionales y probióticos	1
1.2 Beneficios generados por el consumo de los probióticos	3
1.3 <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	5
1.4 Nutrición y cáncer	6
1.5 Cáncer colorrectal (CCR)	6
1.6 Microbiota, probióticos y prevención del cáncer	8
1.7 Proteoma y proteómica	9
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	11
<b>III. OBJETIVOS</b>	12
3.1 Objetivo General	12
3.2 Objetivos Específicos	12
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	13
4.1 Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	13
4.2 Cultivo celular y medio de cultivo	13
4.3 Preparación de muestras para la interacción de LcS con células de colon	13
4.4 Ensayo de adhesión celular	14
4.5 Extracción de proteínas de células de colon	14

4.6	Electroforesis 1-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN	15
4.7	Patrón 2-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN	15
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	16
5.1	Aislamiento y cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	16
5.2	Ensayo de adhesión celular en células de colon	17
5.3	Perfil de proteínas de células de colon SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	18
5.3.1	Proteínas de choque térmico	22
5.3.2	Proteínas involucradas en el metabolismo	22
5.3.3	Factores de traducción	24
5.3.4	Motilidad	24
5.4	Electroforesis en 2-DE de proteínas de células SW480 y CCD841CoN	25
5.5	Análisis de geles 2-DE	26
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	28
<b>VII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	29
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	30
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b>	36
	Anexo 1. Medio de cultivo MRS	36
	Anexo 2. PBS	37
	Anexo 3. Solución de rehidratado urea-tiourea	38
	Anexo 4. Identificación de proteínas diferencialmente acumuladas en las células de colon humano antes y después de la interacción con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	39



## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Identificación por LC-MS/MS de proteínas diferencialmente acumuladas en células de cáncer de colon (SW480) antes y después de la interacción con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	21

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Fig. 1</b> Beneficios a la salud otorgados por el consumo de los probióticos	3
<b>Fig. 2</b> Morfología de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	5
<b>Fig. 3</b> Etapas de desarrollo del cáncer de colon	7
<b>Fig. 4</b> Observación de morfología por tinción de Gram de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	16
<b>Fig. 5</b> Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en medio MRS	17
<b>Fig. 6</b> Microscopia electrónica de barrido mostrando adhesión de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	18
<b>Fig. 7</b> Micrografía en microscopio invertido de las líneas celulares CCD841CoN y SW480 en estado confluyente	19
<b>Fig. 8</b> Perfil electroforético en geles 1-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	20
<b>Fig. 9</b> Perfil electroforético en geles 2-DE de proteínas de células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	26

# Resumen

## **Análisis proteómico de células de colon humano antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota**

La dieta juega un papel importante en la prevención y la reducción de la progresión en las enfermedades crónico degenerativas tales como el cáncer (siendo el cáncer colorrectal (CCR) uno de los principales problemas de salud en el mundo), ya que algunos de sus componentes modifican la microbiota intestinal. Los alimentos funcionales o nutracéuticos contribuyen a una ingesta adecuada de nutrientes y por lo tanto ayudan a prevenir enfermedades. Los probióticos o microorganismos benéficos para la salud se han definido como alimentos funcionales y uno de los probióticos más conocidos y comercializados es el *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) en el Yakult®. Se ha reportado que LcS ayuda en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sin embargo, aún no se conoce a fondo los mecanismos por los cuáles ejercen esta función. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue analizar los cambios de los perfiles de proteínas de células de cáncer de colon humanas (SW480) y células de colon normal (CCD841CoN) antes y después de interactuar con LcS. Se analizaron los cambios de proteínas de células de colon empleando geles en una dimensión (1-DE) y en dos dimensiones (2-DE). Las proteínas diferencialmente acumuladas fueron identificadas por nanoUPLC-MS/MS. Las proteínas identificadas están involucradas con proliferación celular tumoral (anexina 2) y resistencia a quimio y radioterapia, tales como las proteínas heat shock (HSP70) y la piruvato quinasa M2. El tratamiento con LcS favorece a la inhibición de estas proteínas, por lo que podrían ser blancos terapéuticos para la prevención y/o tratamiento del CCR.

**Palabras clave:** Probióticos, LcS, cáncer colorrectal, células SW480, células CCD841CoN, proteómica.

## Abstract

### **Proteomic analysis of human colon cells before and after interaction with *Lactobacillus casei* Shirota**

Diet plays an important role in the prevention and reduction of progression in chronic degenerative diseases such as cancer (being colorectal cancer (CRC) a major health problem in the world), because some components modify the intestinal microbiota. The functional foods or nutraceuticals contribute to an adequate intake of nutrients and thus help prevent disease. Probiotics or beneficial microorganisms for health are defined as functional foods and one of the best known and marketed probiotics is the *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) in Yakult. It has been reported that LcS aid in the prevention and treatment of gastrointestinal diseases, however, is not yet known in depth the mechanisms by which exert this function. Therefore, the purpose of this study was to analyze the changes in the protein profiles of cells of human colon cancer (SW480) and normal colon cells (CCD841CoN) before and after interacting with LcS. Changes colon cell protein using gels in one dimension (1-DE) and two-dimensional (2-DE) were analyzed. Differentially accumulated proteins were identified by nanoUPLC-MS / MS. Identified proteins are involved in tumor cell proliferation (annexin 2) and resistance to chemotherapy and radiotherapy, such as heat shock proteins (HSP70) and pyruvate kinase M2. LcS treatment favors inhibition of these proteins, which may be therapeutic targets for the prevention and / or treatment of CRC.

**Keywords:** Probiotics, LcS, colorectal cancer, SW480 cells, CCD841CoN cells, proteomics

# I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad algunas investigaciones han revelado el importante papel que tiene la dieta en la prevención y la reducción de la progresión en las enfermedades crónico degenerativas tales como el cáncer, la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares, que actualmente están entre las primeras causas de muerte. Es por esto que la dieta y el fomento de hábitos de vida saludables se ha convertido en un componente esencial de los planes de salud pública, orientados al mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades [1,2]. Como consecuencia de esta situación, los alimentos funcionales o nutracéuticos han llegado a ser importantes debido a que ayudan a compensar algunos desequilibrios alimentarios, contribuyen a una ingesta adecuada de nutrimentos y ayudan a prevenir enfermedades. Se ha demostrado que muchos alimentos tradicionales como las frutas, las verduras, el pescado y la leche forman parte de este tipo de alimentos ya que contienen componentes que resultan benéficos para nuestro organismo. Los probióticos también se consideran alimentos funcionales ya que son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos para la salud del consumidor [3].

## 1.1 Alimentos funcionales y probióticos

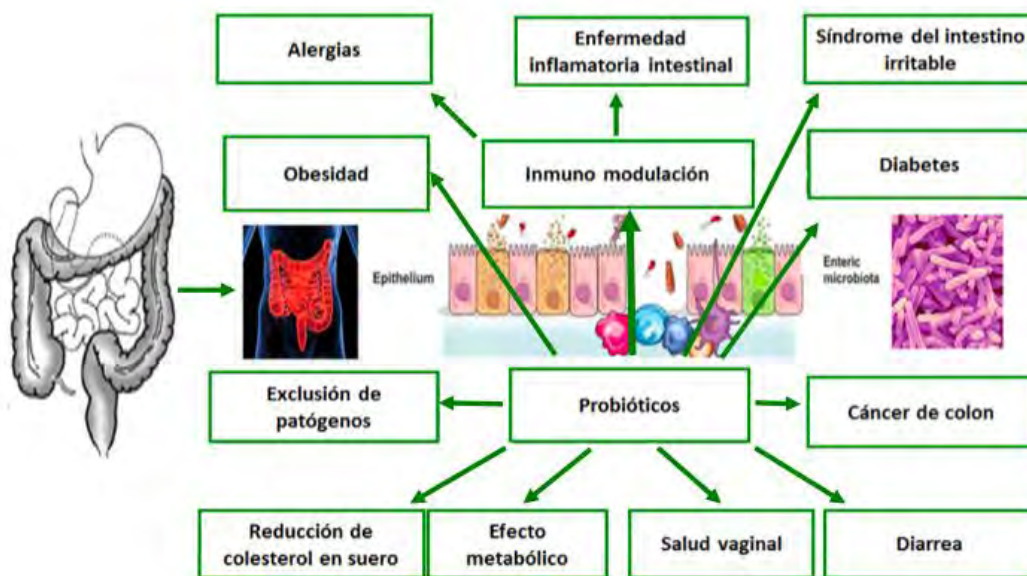
El término alimentos funcionales surgió en Japón por primera vez en la década de los 80's [4], y se definen como aquellos productos alimenticios que gracias a sus componentes proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica, es decir, producen un impacto benéfico, clínicamente comprobado sobre la salud. Entre sus principales características encontramos que cuentan con cualidades nutritivas y benéficas para diversas funciones del organismo, mejoran el estado de salud, previenen o disminuyen el riesgo de contraer enfermedades y su consumo no causa efectos nocivos [5]. El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a mejorar la

calidad de la dieta y la selección de alimentos que puedan generar un efecto positivo en la salud y bienestar del individuo.

Los probióticos pertenecen al grupo de los alimentos funcionales, el término probiótico es de origen griego y significa “*en pro de la vida*”. La OMS en conjunto con la FAO, propusieron una definición que es mundialmente aceptada: “Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ( $10^7$ - $10^{10}$  UFC) confieren beneficios a la salud del huésped” [7]. Los probióticos se encuentran ampliamente disponibles para los consumidores, por ejemplo, se pueden encontrar en alimentos como el yogurt, queso, leche fermentada, zumos, batidos, cereales y fórmula para bebés. Este tipo de microorganismos se han consumido por cientos de años en alimentos tales como el yogurt, pero no fue sino a inicios del siglo XX que los científicos comenzaron a investigar las razones de los beneficios de su consumo [8]. Los probióticos utilizados para consumo humano son principalmente bacterias lácticas empleadas tradicionalmente en fermentaciones alimentarias o aisladas de humanos, la mayoría de estas bacterias pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en menor cantidad se encuentran especies de los géneros *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), una característica particular es que son microorganismos que presentan un estatus GRAS (por sus siglas en inglés Generally Regarded As Safe), lo cual significa que son seguras ya que a lo largo de la historia su consumo no ha presentado riesgos para la salud [9]. Algunos de estos microorganismos pertenecen al grupo de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y organismos relacionados, por su capacidad de producir ácido láctico [10,11]. Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino [12, 13].

## 1.2 Beneficios generados por el consumo de los probióticos

Los beneficios que ofrecen los probióticos, se pueden categorizar en nutricionales y terapéuticos. Dentro de los nutricionales se encuentra su papel para aumentar la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo. A nivel terapéutico, se pueden utilizar para tratamientos de desórdenes intestinales e hipercolesterolemia, supresión de enzimas pro-carcinogénicas e inmunomodulación, entre otros (Figura 1) [14, 15].



**Fig. 1. Beneficios a la salud otorgados por el consumo de los probióticos.** Relación que existe entre el consumo de probióticos, y algunos de los beneficios que estos tienen al regular la microbiota intestinal. (Modificado de Rupa y Mine [15]).

Uno de los papeles más estudiados de los probióticos es el que desempeñan en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, se ha observado que la administración de *Lactobacillus* como un agente profiláctico durante un tratamiento con antibióticos reduce el riesgo de desarrollar este tipo de diarrea en personas adultas, sin embargo no se presenta el mismo efecto en pacientes pediátricos. Algunos de los mecanismos que al parecer explican la acción de los probióticos en los episodios diarreicos son la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactantes) y la disminución del pH intestinal por el estímulo de organismos productores de ácido láctico, favoreciendo el crecimiento de organismos benéficos [16]. Las

propiedades inmunomoduladoras de los probióticos pueden presentarse a nivel de la mucosa o a nivel sistémico. La inmunomodulación a nivel de la mucosa intestinal, parece ser debido al hecho de que las bacterias intactas pueden unirse a la superficie luminal de las células M que se encuentran en la superficie epitelial de las placas de Peyer, dando lugar a la estimulación del tejido linfóide intestinal subyacente, ya que estas células M pueden ofrecer cierta permeabilidad a los componentes del lumen. Este fenómeno juega un papel importante en un cierto número de procesos directamente dependientes del tejido linfóide asociado a mucosas. Estos procesos son: prevención de infecciones, exclusión antigénica (efecto barrera mediado por la inmunoglobulina A), y en general, regulación de respuestas inmunes que a nivel de la mucosa intestinal, son factores claves en el desarrollo de afecciones gastrointestinales con componente inflamatorio [17].

Las alergias son la respuesta del sistema inmunológico a un alimento, inhalante (sustancias en el aire) o sustancia química en particular. Los alérgenos alimenticios, como las proteínas de leche de vaca o el gluten, pueden provocar una respuesta pro-inflamatoria en el intestino por alteración de la función de la barrera intestinal. Los probióticos actúan reduciendo la inflamación intestinal, corrigiendo el desbalance de los linfocitos y estimulando a las citoquinas de los linfocitos Th1 (IL-12 e IFN-gamma). Son varias las enfermedades inflamatorias crónicas que han aumentado su prevalencia en la actualidad. Diversos ensayos *in vitro* han mostrado que algunos elementos bacterianos pueden inducir mecanismos antiinflamatorios en la mucosa intestinal mediante la reducción significativa de la liberación de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por la mucosa inflamada, y con una reducción de la expresión de CD25 en linfocitos T de la lámina propia. Dado que la expresión de CD25 es un marcador que indica el estado de activación de los linfocitos T, estos datos sugieren que la interacción bacteria-epitelio induce cambios que se translucen a la lámina propia de la mucosa intestinal, y modulan la respuesta inflamatoria [16, 17, 18].

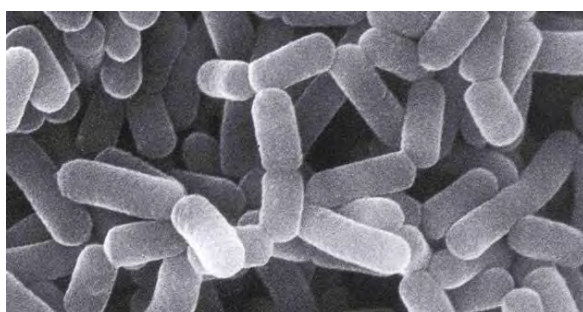
El uso de probióticos en personas con intolerancia a la lactosa reduce los síntomas de inflamación o hinchazón, posiblemente como consecuencia de la presencia de la lactasa microbiana presente en las bacterias ácidolácticas, mejorando así la digestión de la lactosa. Sin embargo aunque existe evidencia



en relación a que algunas cepas de probióticos pueden ser efectivas, se necesita mayor investigación, especialmente estudios clínicos con cepas específicas y metodologías objetivas [16, 17, 18]. La capacidad de algunas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de presentar actividad sobre los ácidos biliares sugiere que pueden tener un control sobre los niveles de colesterol en el humano, ya que el colesterol es un precursor de los ácidos biliares [19].

### 1.3 *Lactobacillus casei* Shirota

Entre las bacterias probióticas que confieren algunos de los beneficios anteriormente mencionados, se encuentra el género *Lactobacillus* que comprende bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que comúnmente producen ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de hidratos de carbono. Generalmente son aislados a partir de leches fermentadas y del tracto gastrointestinal de humanos y animales [19]. *Lactobacillus casei* Shirota, fue descubierta por primera vez por el Dr. Minoru Shirota en 1930, y ha sido utilizada ampliamente en la industria por sus propiedades probióticas como cultivos promotores de la salud (Figura 2) [21, 22].



**Fig. 2. Morfología de *Lactobacillus casei* Shirota.** Microscopia electrónica de barrido de *Lactobacillus casei* Shirota. (Tomado de Boletín Yakult [22])

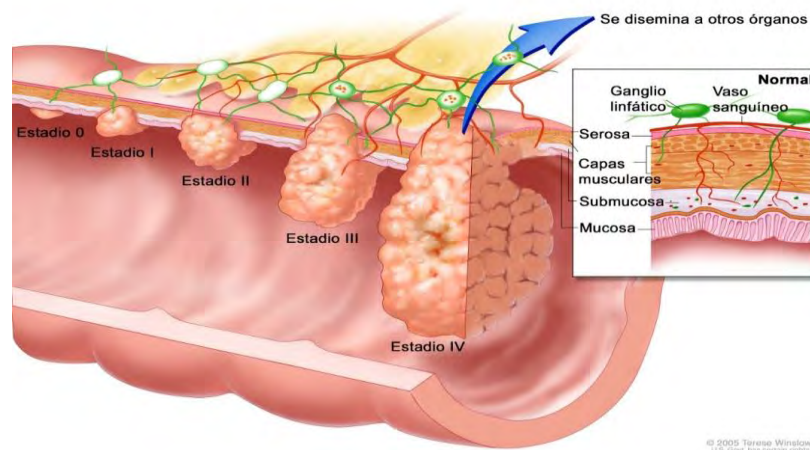
Los principales productos comercializados en México y que contienen este microorganismo, son los de la familia Yakult®. Productos lácteos fermentados que contienen más de 8 mil millones de *Lactobacillus casei* Shirota capaces de llegar vivos al intestino mejorando las propiedades de la flora intestinal [22].

## **1.4 Nutrición y cáncer**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la división no regulada y la propagación celular que causan cerca del 13% de todas las muertes. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer se clasifica según el tejido a partir del cual las células cancerosas se originan [23]. El interés en la nutrición y su relación con las enfermedades como el cáncer tiene su origen en estudios realizados en los años 60's, en los que se relacionaron una dieta rica en fibra con un riesgo reducido de cáncer de colon. Los epidemiólogos sugieren que la mayoría de los cánceres, entre el 65 y el 70%, son generados por factores asociados al estilo de vida, en particular el uso del tabaco, el alcohol y la dieta. Por tanto, dejar de fumar, disminuir el consumo de alcohol y modificar la alimentación desempeña un papel clave en la prevención primaria del cáncer [10,23].

## **1.5 Cáncer colorrectal (CCR)**

El cáncer de colon, también llamado cáncer colorrectal (CCR) es una patología en la que las células malignas se localizan en la porción intermedia y más larga del intestino grueso, comienza con la formación de un pólipo adenomatoso en el colon, y presentando varias fases de la enfermedad que van desde el estadio 0 donde el cáncer es muy incipiente en la capa más interna del intestino, hasta el estadio IV donde el cáncer ya se ha diseminado a otros órganos por fuera del colon (Figura 3) [23, 24, 25].



**Fig. 3. Etapas de desarrollo del cáncer de colon.** (Tomada del Instituto Nacional de Cáncer de EE.UU. [25]).

El CCR es uno de los principales problemas de salud en el mundo, lo que representa el tumor maligno más común del tracto gastrointestinal, es la segunda causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos, mientras que en México es la tercera. En las mujeres ocupa el tercer lugar luego del cáncer de pulmón y el de seno, y en los hombres, el tercer lugar luego del cáncer pulmonar y el de próstata. La incidencia y la mortalidad son similares en ambos sexos [27, 28]. A pesar de ser una neoplasia ubicada en pacientes de edad avanzada con una media de diagnóstico de 50.8 años, cada día se detectan casos en población más joven, de ahí la importancia de realizar un diagnóstico oportuno [28]. Se estima que la mayoría de los cánceres de colon pueden deberse a la dieta (aproximadamente el 75-80% de los casos son esporádicos y un 20% tienen una influencia genética). Diversos autores han sugerido hipótesis que llevan a la conclusión que los componentes de la dieta han modificado la microbiota, es decir, la cantidad y tipo de microorganismos de la luz intestinal colónica podrían inducir la aparición del cáncer de colon [29]. Durante las últimas décadas, diferentes estudios han demostrado que la ingesta de carne roja y procesada y los azúcares, granos y almidón altamente refinados incrementan el riesgo de CCR [28, 29].

## 1.6 Microbiota, probióticos y prevención del cáncer

El tracto gastrointestinal está colonizado por una compleja y dinámica comunidad de microorganismos, constituida por más de 400 especies diferentes, que en conjunto constituyen la microbiota intestinal. La distribución de microorganismos en el sistema digestivo es variada, habitando tan sólo en el colon de  $10^{13}$  a  $10^{14}$  microorganismos. Esta microbiota endógena forma una relación simbiótica con el huésped, y esta estrecha asociación ayuda a mantener la homeostasis mediante la realización de tareas esenciales de naturaleza nutricional y energética, equilibrando el sistema inmunitario y la exclusión de patógenos [30, 31, 32].

Diversos estudios indican que varios mecanismos podrían explicar la acción preventiva de los probióticos en la aparición de CCR, incluyendo [13, 16, 33, 34, 35, 36]:

- a) El mejoramiento de la respuesta inmune del huésped debido a que la interacción entre los probióticos o sus metabolitos y las células inmunocompetentes resulta en la secreción de citoquinas que se conoce que tienen una multitud de efectos en el funcionamiento del sistema inmune [34].
- b) La inactivación de compuestos cancerígenos ya que se ha encontrado que las bacterias ácido lácticas y otras bacterias comensales pueden atrapar y/o metabolizar varios agentes carcinógenos, incluyendo las aminas aromáticas heterocíclicas (HCA), y compuestos nitrosos [35].
- c) Los efectos antiproliferativos a través de la regulación de la proliferación celular. Existe evidencia de que los probióticos pueden tener un papel importante en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, que son mecanismos potencialmente cruciales en la prevención del cáncer de colon [35, 36, 37].

Para llegar a entender estos procesos moleculares, es necesario conocer las vías de transducción de señales y las interacciones entre proteínas y otras moléculas que influyen en la función celular [38].

## 1.7 Proteoma y proteómica

El proteoma de una célula o de un orgánulo proporciona información sobre el conjunto de proteínas expresadas en esa célula u orgánulo bajo ciertas condiciones fisiológicas y en un momento específico en el tiempo. El término proteoma fue empleado por primera vez por Wasinger y cols. [39], posteriormente surge el término de Proteómica para referirse a la disciplina que se encarga del estudio del proteoma. La Proteómica se interesa por el nivel de expresión de las proteínas, por la estructura y la función proteínica [39]. La investigación del proteoma en distintos estados patológicos y su comparación con estados saludables permite la identificación de cambios moleculares que pueden ser responsables de esos procesos. El análisis proteómico de distintos estados patológicos podría conducir a mejorar el conocimiento de las interacciones y de las funciones de las distintas proteínas [38]. Los estudios de la interacción de probióticos con las células del hospedador son de gran importancia ya que ayudarán en la comprensión de los mecanismos moleculares que se dan entre célula-hospedador y la proteómica es una herramienta con alto potencial para su estudio.

Para el género *Lactobacillus* se han identificado las siguientes proteínas específicas que permiten la interacción con células y estructuras propias del hospedador [39]:

- Proteínas secretadas que interaccionan con la matriz de proteínas extracelulares y del mucus.
- Adhesinas, proteínas de adhesión o unión específica a glicoproteínas humanas.
- Proteínas reguladoras que interaccionan con receptores específicos de las células dendríticas inmaduras y las funciones de las células T.

Los principales enfoques para la identificación de proteínas son [39]:

1. Enfoque en gel, donde la visualización de proteínas se realiza en un gel de dos dimensiones, separándose las mismas por su masa y punto isoeléctrico, y posteriormente se escinde, digiere e identifica por espectrofotometría de masas.
2. Identificación proteínica por tecnología multidimensional, en la que se digiere previamente la mezcla de proteínas, los péptidos resultantes se

separan por cromatografía multidimensional y se procede a la detección *in situ* de los péptidos y a su secuenciación.

## II. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de CCR ha aumentado en los últimos años afectando cada vez más a población más joven. Esta patología representa un problema de salud pública en México y en el mundo. Se ha observado que la alimentación y los hábitos de vida, como el sedentarismo y otros factores de riesgo, están asociados al cáncer. El seguimiento de una dieta correcta, en conjunto a la adopción de hábitos saludables de vida tales como la actividad física diaria, contribuyen a la prevención de enfermedades de tipo crónico degenerativas, ya que ciertos alimentos, además de aportar beneficios nutrimentales, confieren beneficios a la salud. Se ha propuesto que la ingestión de probióticos genera efectos benéficos a la salud, contrarrestando el desarrollo del CCR. Aunque aún son pocos los estudios que apoyan estos efectos, sin embargo, se sabe que los probióticos afectan el ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios de la mucosa intestinal.

El conocimiento del proteoma constituye uno de los desafíos más importantes de la era postgenómica. A diferencia del genoma, el proteoma presenta una variabilidad estructural y funcional, que depende de cada individuo, de su estado de desarrollo, del tejido estudiado, e incluso de las condiciones ambientales. El análisis de dicha variabilidad está asociado tanto al funcionamiento normal del organismo como a muchas de sus patologías.

En este trabajo nos enfocamos en analizar los cambios del proteoma de células de colon humanas cuando se ponen en contacto con el probiótico *Lactobacillus casei* Shirota. Estos estudios generarán conocimiento que ayudarán a comprender los mecanismos de interacción célula-probiótico, información que permitirá entender los mecanismos por los cuales LcS puede contribuir a la prevención y/o tratamiento de CCR.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Analizar los cambios en el perfil proteómico de las células *in vitro* de colon humano cuando interactúan con *Lactobacillus casei* Shirota.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Aislar y cultivar el *Lactobacillus casei* Shirota a partir del producto comercial Yakult
- Cultivar las líneas celulares SW480 (células de cáncer de colon humano) y CCD841CoN (células de colon humano normales)
- Realizar la interacción de células SW480 y CCD841CoN con *Lactobacillus casei* Shirota
- Aislar las proteínas de las células SW480 antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota
- Aislar las proteínas de las células CCD841CoN antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota
- Comparar y analizar el perfil proteómico en geles 2-DE de las proteínas obtenidas de las células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota
- Identificar por LC-MS/MS las proteínas diferencialmente acumuladas



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota

*Lactobacillus casei* Shirota (LcS) se aisló del producto comercial Yakult. El contenido de un envase de Yakult se centrifugó a 13000rpm por 10 min y el precipitado se inoculó en medio Mann Rogosa & Sharpe (MRS) suplementado con 0.05% L-cisteína (p/v) (Anexo 1), y se incubó en condiciones anaerobias (jarra BBL GasPak) a 37°C. Se tomaron muestras en la fase logarítmica (15-22 h). Las células se recuperaron por centrifugación y se lavaron 3 veces con solución de Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 (3 lavados). La concentración de bacterias se determinó por la absorbancia a 600nm en un lector de microplaca (Multiskan GO Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, IL, USA) y se ajustó la absorbancia a 0.5 que corresponde a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para realizar los ensayos de interacción bacteria-célula.

### 4.2 Cultivo celular y medio de cultivo

Las líneas celulares SW480 (células de cáncer de colon humanas) y CCD841CoN (células normales de colon humano) fueron mantenidas en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El medio de cultivo fue suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino, 10 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células se sembraron en placas de 15 cm a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/placa y se incubaron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.3 Preparación de muestras para la interacción de LcS con células de colon

Para ajustar la concentración de LcS se midió la cantidad de bacterias por medio de densidad óptica (OD) a través de un lector de microplacas (Multiskan GO Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). De acuerdo a las concentraciones dadas se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de muestra (µL)

que se necesitó para una concentración final de O.D. de 0.5, que corresponde a una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias que fue la cantidad que estuvo en contacto con las células de colon.

#### **4.4 Ensayo de adhesión celular**

Para el ensayo de adhesión celular las líneas celulares de colon se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de 90-100%. A este momento se les agregó la suspensión de *LcS* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL y se dejaron interaccionar por al menos 2 h (Modificado de Piatek y cols, [40]). Al término de este tiempo, el medio de cultivo fue eliminado y se realizaron 3 lavados con PBS (Anexo 2) para retirar las bacterias no adheridas. Se realizó un cuarto lavado con solución 1% de Triton X-100, para desprender las bacterias que quedaron adheridas a las células. La solución de este lavado se recuperó y se realizó una dilución seriada para inocular en placa de agar MRS las cuales se incubaron por 15-18 h a 37° C en condiciones anaeróbicas para determinar la cantidad de bacterias que se adhieren. Se realizó la cuantificación directa en placa reportando como unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.5 Extracción de proteínas de células de colon**

La extracción de proteínas de las células SW480 y CCD841CoN se llevó a cabo empleando buffer de lisis el cual contiene 7M urea, 2M tiourea, 1% Triton X-100, 100mM DTT, 2mM PMSF. Las células se sonicaron por 20 min en hielo y se centrifugaron a 6500 rpm por 20 min. El sobrenadante fue colectado y las proteínas fueron precipitadas con 4 volúmenes de acetona fría por 2 h a -20°C, se recuperaron a 13000 rpm por 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió en solución de rehidratado (Anexo 3).

#### **4.6 Electroforesis 1-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN**

El perfil proteómico de las células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *LcS* se obtuvo empleando geles de poliacrilamida al 12%, en una dimensión, en condiciones reductoras. Los geles se corrieron en cámara de electroforesis mini protean III de Bio Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a voltaje de 90V. La tinción se realizó con azul de coomassie G-250 (USB corporation, Cleveland, OH, USA).

#### **4.7 Patrón 2-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN**

El perfil de proteínas en geles en dos dimensiones (2-DE) de las células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *LcS* se obtuvo separando las proteínas en la primera dimensión en tiras de isoelectroenfoque de 13 cm con un rango de pH de 3-10 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) se emplearon para la separación de las proteínas de las células SW480. La primera dimensión se corrió en el sistema IPGphor (Amersham, Little Chalfont, UK) y la segunda dimensión o separación por peso molecular se llevó a cabo en geles de acrilamida al 12% empleando la cámara SE 600 Ruby (GE Healthcare).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento y cultivo de *Lactobacillus casei* Shirota

*Lactobacillus casei* Shirota (LcS) se aisló del producto comercial Yakult, se cultivó y realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio para corroborar que fueran bacilos gram positivos así como la pureza del cultivo, esto es que no hubiese otras formas bacterianas presentes (Figura 4).

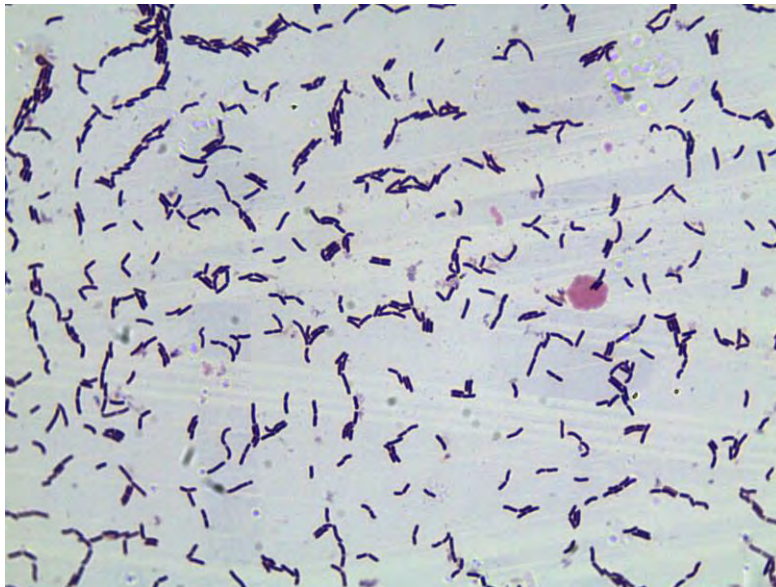
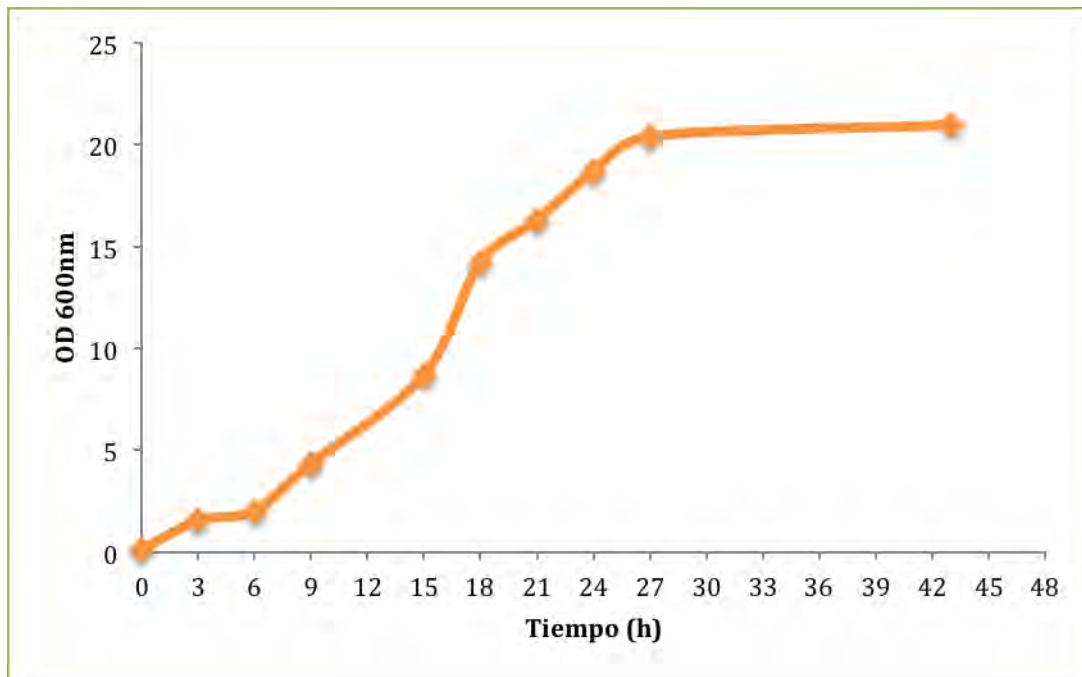


Fig. 4. Observación de la morfología por tinción de Gram de *Lactobacillus casei* Shirota

Se realizó una cinética de crecimiento de LcS (Figura 5), determinándose que la fase exponencial inicia a partir de las 6 h y se prolonga hasta las 24 h, que es cuando inicia la fase estacionaria. El aislamiento y cultivo de la bacteria fue sencillo, sin embargo, la bacteria presenta una vida corta y es difícil conservarla en placa por cultivos sucesivos por lo cual fue necesario realizar aislamiento en diversas ocasiones a fin de contar con la bacteria en condiciones óptimas.

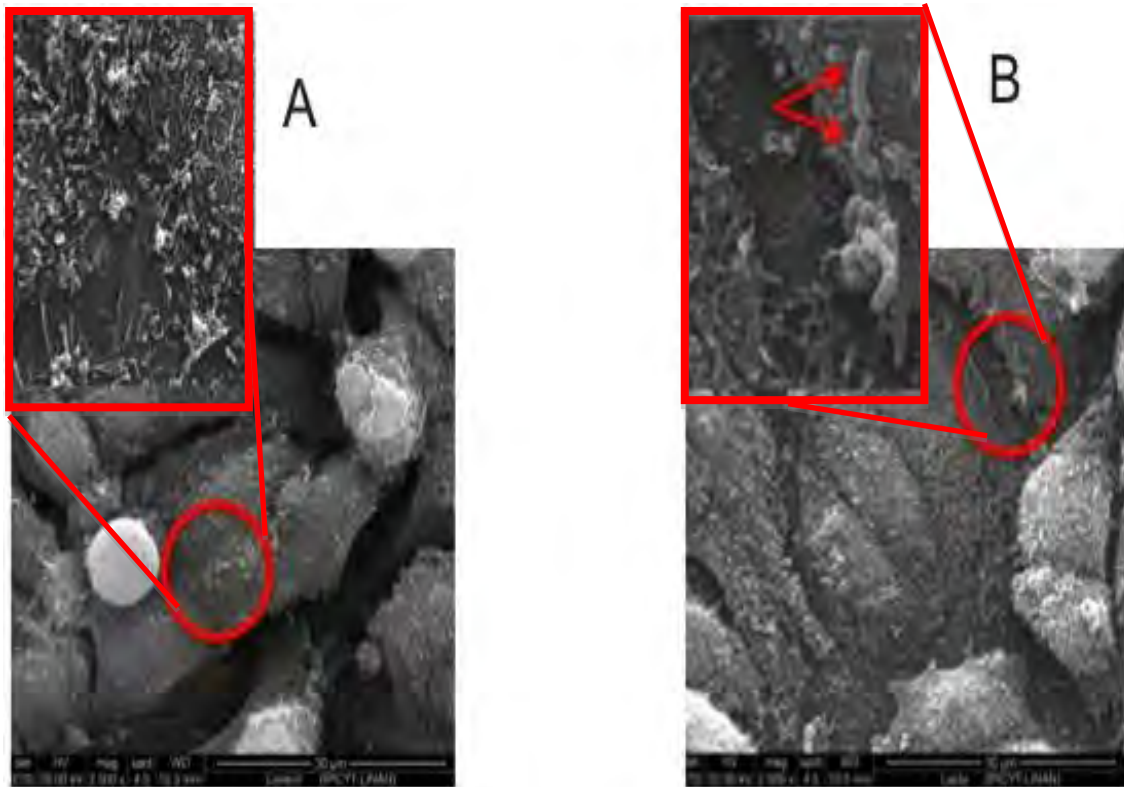


**Fig. 5. Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota en medio MRS.** La curva de crecimiento muestra que a partir de las 6 h *LcS* inicia la fase exponencial. Para los ensayos, se utilizó la bacteria a partir de las 15 h. El crecimiento se evaluó con la lectura de densidad óptica (OD) a 600 nm

Para los estudios de interacción con las células, se trabajó con *LcS* en su fase exponencial, tomándose las muestras en el punto medio de esta fase (15 h) esto permitió obtener una concentración de células adecuada para realizar los experimentos.

## 5.2 Ensayo de adhesión celular en células de colon

Para determinar si *LcS* se adhiere a las células de colon, se realizó el ensayo de adhesión dejando interactuar por 2 h las células de colon con las bacterias. Después de este tiempo las células se lavaron para eliminar las bacterias no adheridas, se fijaron y obtuvieron las imágenes por microscopía electrónica de barrido (Figura 6).

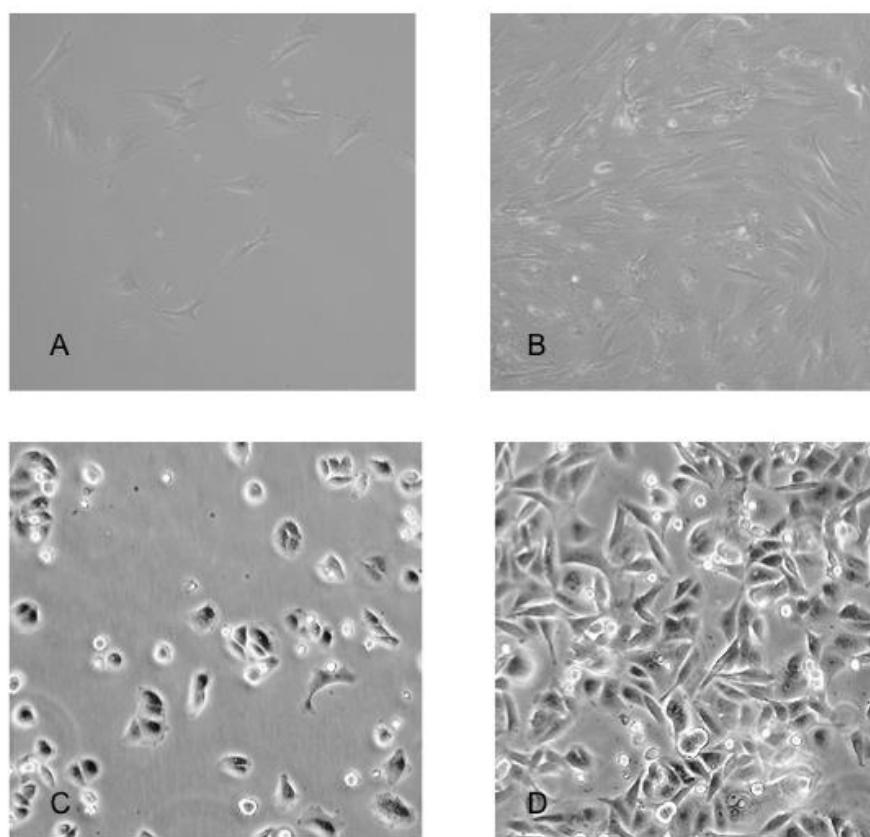


**Fig. 6. Microscopia electrónica de barrido mostrando adhesión de *Lactobacillus casei* Shirota.** Imagen de microscopia electrónica de barrido de la adhesión de *Lactobacillus casei* Shirota a células SW480. A) células SW480 antes y B) después de la interacción con LcS). La ampliación de la parte superior izquierda en A) muestra la membrana de las células y en B) muestra los *Lactobacillus* adheridos a la membrana celular.

Se ha reportado que LcS es una bacteria transitoria y que no es necesaria la adherencia al intestino para poder ejercer un efecto benéfico para la salud del hospedador y que dependiendo de la línea celular y de la especie de *Lactobacillus*, se presenta una adherencia del 3 al 14% [41]. Tuomola y Salminen [41] reportaron la adhesión de diferentes especies de *Lactobacillus* con CaCo2, mostrando que *L. casei* presenta un 14.4% de adhesión, mientras que *L. casei* Shirota presenta 3.2% [41]. Nuestros resultados mostraron un valor de adhesión de 1.7%, por lo se encuentra un poco bajo a lo reportado anteriormente con células CaCo2, esto probablemente se debe a diferencias de la línea celular y/o al método de cuantificación de la adhesión.

### 5.3 Perfil de proteínas de células de colon SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota

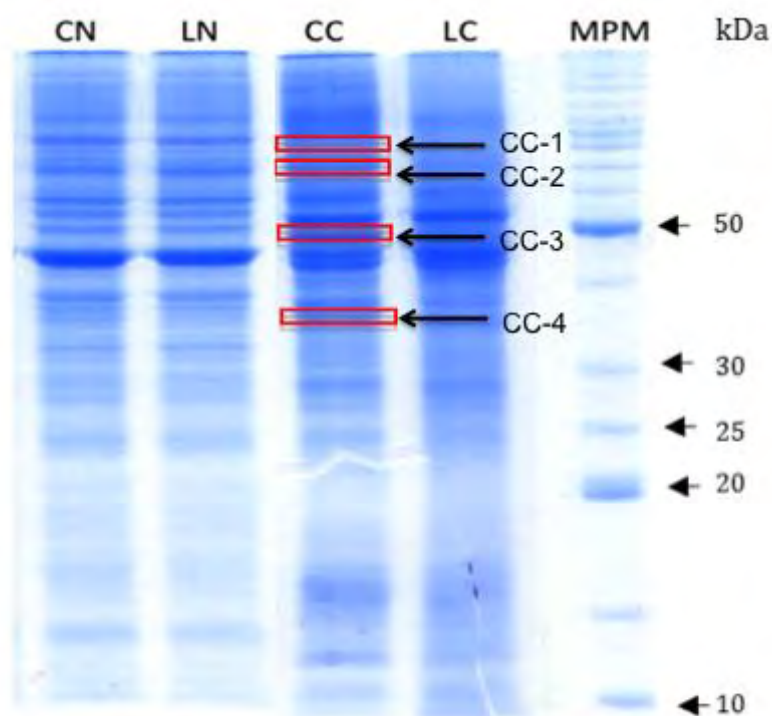
En la Figura 7 se puede observar la diferencia morfológica entre la línea celular de colon con cáncer (SW480) y la normal (CCD841CoN). Mientras que las células con cáncer tienen una forma romboide alargada y tienden a agruparse entre si, las células normales son más largas y delgadas y se agrupan poco.



**Fig. 7. Micrografía en microscopio invertido de las líneas celulares CCD841CoN y SW480 en estado confluyente.** A: Células CCD841CoN en una baja densidad de confluencia. B: Células CCD841CoN en alta densidad de confluencia. C: Células SW480 en una baja densidad de confluencia. D: Células SW480 en alta densidad de confluencia.

El perfil proteómico de las células de colon fue obtenido cuando las células se encontraban a una confluencia de 90-100% (Figura 7). A este punto, las células fueron recuperadas y se extrajeron las proteínas totales solubles. Para determinar la calidad y concentración de las proteínas extraídas de ambas líneas celulares antes y después de la interacción con *LcS* se realizó una electroforesis en una dimensión (1-DE).

En el perfil 1-DE se observaron algunas diferencias en la acumulación de proteínas cuando se comparan las líneas celulares (SW480 vs CCD841CoN), así como cuando se comparan los perfiles de las líneas celulares antes y después de su interacción con *LcS* (Figura 8).



**Fig. 8. Perfil electroforético en geles 1-DE de células de colon SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota.** CN: Células CCD841CoN sin interacción. LN: Células CCD841CoN con interacción. CC: Células SW480 sin interacción. LC: Células SW480 con interacción. MPM: marcador de peso molecular

Las bandas con mayor densidad, CC-1 a 4, solo se encontraron en las células con cáncer (SW840) antes de la interacción con *LcS*. Después de la interacción, las bandas desaparecen. Estas bandas fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas y posteriormente los datos obtenidos se sometieron al análisis por la base de datos de Mascot. En la Tabla 1 se presentan las proteínas identificadas.



**Tabla 1.** Identificación por LC-MS/MS de proteínas diferencialmente acumuladas en células de cáncer de colon (SW480) antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota

<i>Banda<sup>a</sup></i>	<i>Proteína<sup>b</sup></i>	<i>Organismo<sup>c</sup></i>	<i>Número de acceso<sup>d</sup></i>	<i>Peso Exp.<sup>e</sup></i>	<i>Peso Teórico<sup>f</sup></i>	<i>Score<sup>g</sup></i>
<b>CC-1</b>	Heat shock cognate	Homo sapiens	P11142	70	71	457
	Stress-70 protein, mitochondrial	Homo sapiens	P38646	70	73.92	111
<b>CC-2</b>	Pyruvate kinase PKM	Homo sapiens	P14618	60	58.47	195
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Homo sapiens	P108009	60	61.18	162
<b>CC-3</b>	Alpha-enolase	Homo sapiens	P06733	50	47.48	276
	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	Homo sapiens	Q5VTE0	50	50.49	165
<b>CC-4</b>	Annexin A2	Homo sapiens	P07355	40	38.8	335
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Homo sapiens	P04406	40	36.2	11

<sup>a</sup>Número de la banda seleccionada de acuerdo al perfil proteómico (Fig. 8)

<sup>b</sup>Proteína(s) identificada(s) en la base de datos

<sup>c</sup>Organismo de origen de la proteína identificada

<sup>d</sup>Número de acceso en la base de datos del Swiss Prot

<sup>e</sup>Peso experimental de la proteína

<sup>f</sup>Peso teórico determinado por la base de datos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos

<sup>g</sup>Score reportado en Mascot después de la búsqueda en la base de datos

Las funciones de las proteínas identificadas son variadas. Se pueden encontrar proteínas con funciones enzimáticas en reacciones catalíticas, así como proteínas relacionadas con choque térmico y otras que están ligadas a la supervivencia de las células y proliferación celular.

### **5.3.1 Proteínas de choque térmico**

Se ha demostrado que las proteínas de choque térmico generan la resistencia de cáncer de colon a la apoptosis inducida por curcumina. La expresión elevada de hsp27 y hsp70 en cánceres de mama, endometrial y gástricos está asociada con la metástasis, pobre pronóstico y resistencia a quimio o radioterapia. Se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión de hsp70 es un acercamiento efectivo para aumentar la terapia basada en curcumina en cánceres que son resistentes debido a la expresión de hsp70 [42].

La proteína heat shock cognate (Hspc) ayuda a proteger a las células del estrés. Esta proteína se une a polipéptidos para facilitar un correcto plegamiento de proteínas. También funciona como una ATPasa en el desmontaje de vesículas recubiertas de clatrina (receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL)) y se encuentran especialmente en hígado y otros tejidos periféricos como ovarios y corteza adrenal [43]. También se ha descrito que la Hspc es una proteína altamente conservada y miembro de la familia de chaperonas moleculares, tiene la habilidad de inducir respuesta citotóxica linfocito T (CTL) a través del enlace y acarreamiento de péptidos antigénico, esta información proporciona nuevas alternativas para el desarrollo de una inmunoterapia dirigida a ciertos tipos de cáncer [44].

La proteína mitocondrial stress-70 (Hsp70) tiene un papel en el control de la proliferación celular y también puede actuar como una chaperona. Esta proteína también interactúa con el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 1 (FGF1) y la proteína P53 [43]. La proteína mitocondrial de choque térmico de 60 kDa (HSP60) está implicada en la importación de proteínas mitocondriales y puede facilitar el correcto plegamiento de proteínas importadas [43]. Se han encontrado niveles elevados de HSP60 en sueros de pacientes con CCR por lo que HSP60 parece ser más específico para los estadios tardíos de CCR [45].

### **5.3.2 Proteínas involucradas en el metabolismo**

La piruvato quinasa PKM es una enzima glicolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) a ADP, generando ATP, es importante para la proliferación celular tumoral y la supervivencia [43].

La conversión de la glucosa a lactato es una característica clave de muchas células cancerosas que promueve el rápido crecimiento [46]. La piruvato quinasa M2 (PKM2) es una variante dividida alternativamente del gen de piruvato quinasa que se expresa preferencialmente durante el desarrollo embriogénico y en células cancerosas. PKM2 altera el paso final limitante de la glicólisis dando como resultado el efecto Warburg, o conocido como la glicólisis aeróbica, su expresión incrementa y facilita la producción de lactato en células cancerosas [46].

La modulación de la actividad catalítica de PKM2 también es necesaria para la síntesis de ADN y lípidos que se requieren para la proliferación celular y del NADPH que se utiliza para la homeostasis redox. PKM2 también funciona como una proteína cinasa y como un coactivador transcripcional [46].

La sobreexpresión de PKM2 facilita la translocación nuclear de STAT3, la cual es requerida para la función de PKM2 en la regulación de señalamiento asociadas a migración y adhesión. PKM2 promueve la migración celular del CCR y la adhesión celular mediante la regulación de señalamiento asociado a STAT3. Debido a los efectos pleiotrópicos de PKM2 en la biología del cáncer, por lo tanto esta enzima representa un atractivo blanco terapéutico para la terapia del CCR [47,48].

La alfa enolasa es un enzima multifuncional que además de participar en la glucólisis, desempeña un papel en diversos procesos tales como control de crecimiento, tolerancia a la hipoxia y respuestas alérgicas, además estimula la producción de inmunoglobulinas [43]. La sobreexpresión de la alfa enolasa se ha reportado en varios cánceres incluyendo pulmón, cerebro, mama, colon y próstata y se ha demostrado que la inhibición de la expresión de la alfa enolasa mejora la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos [49].

La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es la enzima encargada de catalizar la sexta etapa de la glucólisis. También puede estar implicada en otros procesos como la activación de la transcripción, el transporte de ARN, la replicación del ADN y la iniciación de la apoptosis [43]. Se sabe que muchas de las células de cáncer presentan una glicólisis aeróbica incrementada confiando en esta vía para la producción de ATP y de intermediarios metabólicos para la proliferación celular. Se ha reportado que la expresión de GAPDH es

significativamente sobre regulada en carcinoma humano colorectal y también se incrementa en líneas celulares de cáncer de colon [50].

### **5.3.3 Factores de traducción**

La proteína putativa de factor de elongación 1-alpha-like 3 promueve la unión del aminoacil-tARN al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas dependientes de GTP [43].

### **5.3.4 Motilidad**

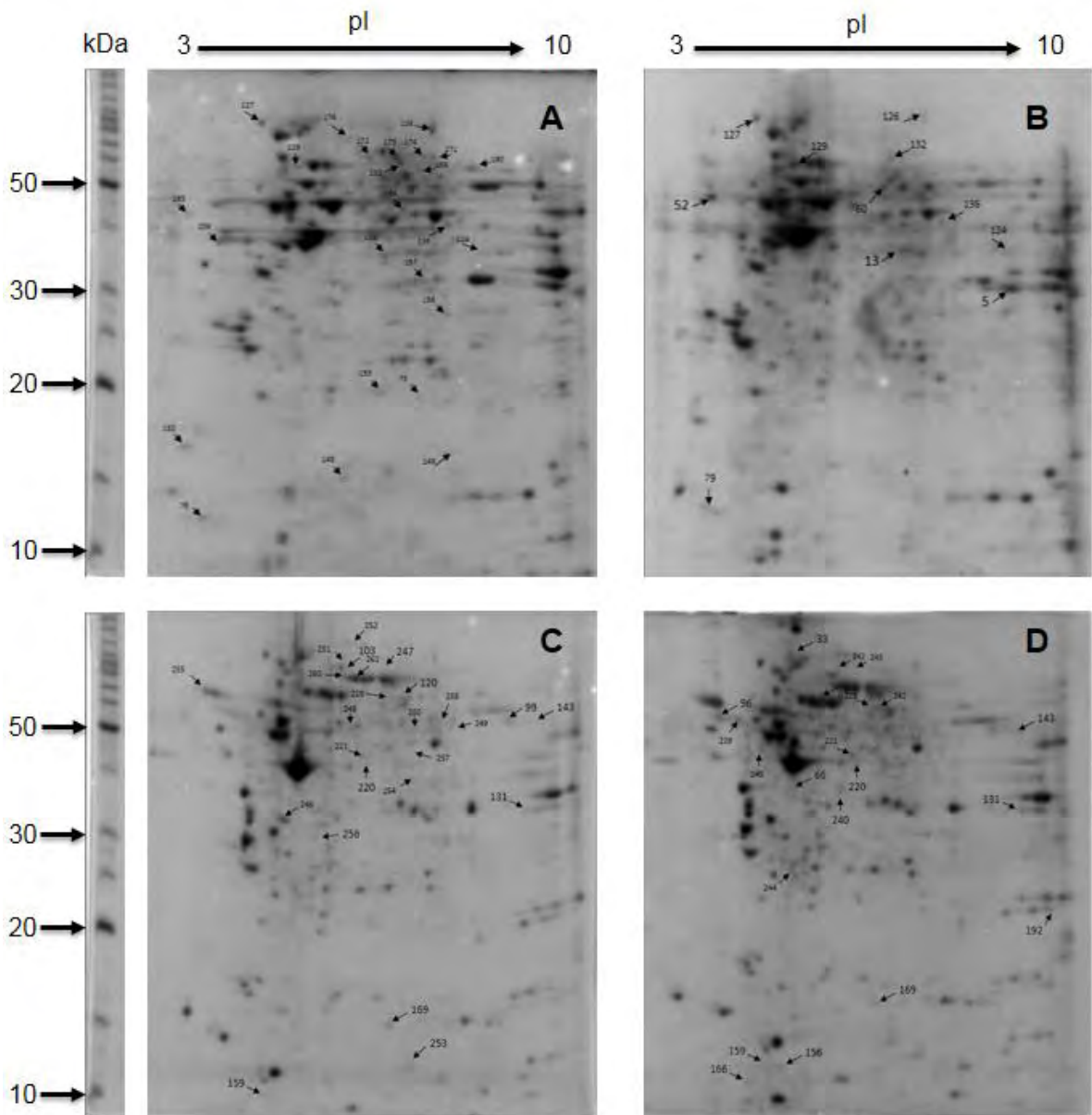
La anexina A2 (ANXA2) está implicada en diversos procesos celulares, tales como la motilidad celular. Es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio cuya función es ayudar a organizar la exocitosis de las proteínas intracelulares al dominio extracelular. Al ser una proteína pleiotrópica, su función depende del lugar y tiempo en el cuerpo [43]. Dirige múltiples procesos biológicos y asociaciones clínicas, especialmente en la progresión del cáncer. Los niveles de expresión de ANXA2 varía entre diferentes tipos de cánceres, especialmente en los cánceres del sistema digestivo, por lo tanto ANXA2 se ha empleado para la detección y diagnóstico del cáncer mediante el monitoreo de su concentración [51] Se ha descrito que la expresión aumentada de ANXA2 aumenta la malignidad mediante el remodelamiento de las microestructuras de células cancerosas [52].

Las proteínas encontradas antes de la interacción con *LcS* están relacionadas de diferentes formas con el cáncer, ya sea para su proliferación, motilidad o para favorecer el desarrollo de resistencia al tratamiento contra el cáncer. Después de la interacción con *LcS*, estas proteínas no están presentes, entonces eso indica que el tratamiento con *LcS* es capaz de inhibir proteínas detectadas en CCR, disminuyendo su proliferación y crecimiento, así como al inhibir la expresión de proteínas como la ANXA2 disminuye la malignidad.

También la interacción con *LcS* puede ayudar a la aceptación y efectividad de tratamientos como la quimioterapia, al inhibir la expresión de proteínas como la alfa enolasa.

#### **5.4 Electroforesis en 2-DE de proteínas de células SW480 y CCD841CoN**

El perfil de proteínas en geles de segunda dimensión (2-DE) de las células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *LcS* se muestra en la Figura 9. En esta figura podemos señalar las proteínas diferenciales con mayor claridad que en la 1-DE (Figura 8). En el perfil de 1-DE no se aprecian los cambios en las proteínas de CCD841CoN mientras que el 2-DE muestra que si existen diferencias en la expresión de las proteínas después interacción con *LcS* en las líneas celulares SW480 y CCD841CoN.



**Fig. 9. Perfil electroforético en geles 2-DE de proteínas de células SW480 y CCD841CoN antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota.** A) Proteínas aisladas de las células SW480 sin la interacción con *LcS*. B) Proteínas extraídas de las células SW480 que estuvieron en interacción con *LcS*. C) Proteínas aisladas de las células CCD841CoN sin la interacción con *LcS*. D) Proteínas extraídas de las células CCD841CoN que estuvieron en interacción con *LcS*. La imagen muestra los spots diferenciales indicados con flechas y numerados de acuerdo a su identificación.

### 5.5 Análisis de geles 2-DE

El análisis de spots en geles 2-DE se realizó empleando el software Melanie 7.0, el cual analiza el contenido de píxeles de los spots para determinar si

existen diferencias significativas en la acumulación comparando la muestra control (sin interacción) con la muestra problema (con interacción) de las líneas celulares SW480 y CCD841CoN. Las proteínas con acumulación mayor o menor de 1.6 veces son proteínas diferencialmente acumuladas entre las muestras. Las proteínas diferenciales fueron asignadas a los spots correspondientes a los geles en segunda dimensión (Figura 9). De este análisis se pudo observar que varias de las proteínas observadas en el gel control (antes de la interacción), no se encuentran en el gel con el tratamiento (después de la interacción). Falta por analizar estas proteínas para determinar su función. En el análisis con Melanie 7.0 se puede observar como después de la interacción no se alcanzan apreciar un gran número de proteínas que si se observan antes de la interacción. Después de la interacción se observa la acumulación de otras proteínas.

## VI. CONCLUSIONES

El CCR es un problema importante de salud pública en todo el mundo, y el encontrar novedosos marcadores moleculares puede contribuir a su eficiente manejo mediante la detección temprana, pronóstico o vigilancia de la enfermedad. Por otro lado se sabe que el consumo de probióticos ayuda a prevenir el desarrollo de cáncer pero los mecanismos de acción aún no son del todo conocidos. Se observaron cambios en la acumulación de proteínas en células de cáncer de colon después de la interacción con *LcS* pero no así en células de colon normales durante la electroforesis 1-DE, sin embargo en la electroforesis 2-DE sí se observaron cambios en la acumulación de proteínas. Esto demuestra que el tratamiento con *LcS* produce cambios en las células de colon humano.

Las proteínas diferenciales observadas en la electroforesis 1-DE fueron analizadas, y se encontró que estas están relacionadas con diversas funciones en la célula, como motilidad, factores de traducción y metabolismo, y su aumento de concentración está asociado con el cáncer. *LcS* es capaz de inhibir la sobre expresión de estas proteínas disminuyendo su concentración y por tanto ayudando a restablecer el metabolismo.

El entendimiento de los mecanismos de la progresión metastásica del CCR es esencial para reducir su morbilidad y mortalidad, los datos de 1-DE nos mostraron que la PKM2 y la anexina están asociadas con la progresión del cáncer, ya que promueven un rápido crecimiento en las células cancerosas y aumentan la malignidad. El monitoreo de estas proteínas ha sido empleado para la detección del cáncer. Se ha observado que el inhibir la expresión de proteínas como la alfa enolasa, mejora la sensibilidad a la quimioterapia. Es por eso que el tratamiento con *LcS* favorece la disminución de la expresión de proteínas asociadas a cáncer. Por lo que puede ser usado para la prevención o tratamiento contra el cáncer.



## **VII. PERSPECTIVAS**

Analizar por LC-MS/MS de los spots diferencialmente acumulados encontrados en los geles 2-DE.

Identificar las proteínas por búsqueda en base de datos de los resultados obtenidos por espectrometría de masas.

Determinar la función de las proteínas diferenciales en las células para elucidar el papel que desempeña en el cáncer de colon.

## VIII. REFERENCIAS

1. Debasis B., Francis C.L. and Dilip K.G. (2010). *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals*. USA, CRC Press.
2. Roesch-Dietlen F., Rubio-Arce J.F., Jiménez-García V.A., López-Salinas A., Remes-Troche J.M., Ruiz-Juárez I., Grube-Pagola P., Silva-Cañetas C.F. (2012). Comportamiento epidemiológico de las neoplasias malignas del tracto digestivo en un periodo de 5 años en Veracruz, México. *Revista de Gastroenterología de México* 77(1): 3-8.
3. Guía de alimentos funcionales. [http://www.fesnad.org/publicaciones/pdf/guia\\_alimentos\\_funcionales.pdf](http://www.fesnad.org/publicaciones/pdf/guia_alimentos_funcionales.pdf) (accessed 2013-09-26)
4. Rafter, J. (2003). Probiotics and colon cáncer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5): 849-859.
5. Young, J. (1998). European market developments in prebiotic- and probiotic containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition*; 80: 231-233.
6. Duran, R., Valenzuela A. (2010). La Experiencia Japonesa con los alimentos FOSHU ¿Los verdaderos alimentos funcionales?. *Revista Chilena de Nutrición*; 37 (2): 224-233.
7. FAO, WHO: Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agricultural Organization of United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report 2001 [[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)].
8. Gomes A.M.P. and Malcata F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10 (1999) 139-157.
9. Sanz, Y., y Dalmau J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Española*; 66 (1): 27-31.

10. Serban D.E., (2013). Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics, *Cancer Lett.* 2014 Apr 10;345(2):258-70. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.013.
11. Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. y Nader-Macías F.E. (2012). Probióticos y salud. México, Ediciones Díaz de Santos.
12. Mayorga-Reyes L., Azaola-Espinosa A., y Gutiérrez-Nava A. (2010). Revisión Bibliográfica. Probióticos y su potencial en la prevención del cáncer de colon. *ContactoS*; 77: 10–15.
13. Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J. y Foey, A. (2013). Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defenses: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients*, 5: 1869-1912.
14. Iñiguez-Palomares, C., y Acedo-Félix E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Salus cum propositum vitae*; 7 (2). Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/ensayos/bifidiobacterium.htm> (accesado 2003-09-03).
15. Rupa P., Mine Y. (2012). Recent Advances in the Role of Probiotics in Human Inflammation and Gut Health. *Journal Agricultural Food Chemistry*; 60, 8249–8256.
16. Manzano C., Estupiñán D., y Poveda E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*; 39 (1): 98-110.
17. Gómez, S., y Nova, E. (S/A). Probióticos. *Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación*; 1: 88-102.
18. Taranto, M.P., Médici, M., y Font G. (2005). Alimentos funcionales y probióticos. *Revista Química Viva*; 1 (4): 26-34
19. Rodríguez-González, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
20. Luján-Capra, M. (2007). Bacteriofagos de *Lactobacillus casei/paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral.
21. Figueroa-González, I. (2007). Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* *Shirota* y *Escherichia coli* en un sistema de

- simulación del tracto intestinal. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
22. Boletín Yakult. Inmunonutrición y probióticos. Publicación del Departamento de Difusión de Yakult S.A. de C.V. (2012); 28 (11). [www.yakult.mx](http://www.yakult.mx) (accessed 2013-09-10)
  23. Kumar M., Kumar A., Nagpal R., Mohania D., Behare P., Verma V. y cols. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr.* 2010 Aug;61(5):473-96.
  24. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/index> (accessed 2013-08-25)
  25. Instituto Nacional de Cáncer Instituto Nacional de Cáncer de EE.UU (2013). Estadios de cancer de colon. Imagen recuperada de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/colon/Patient/page2#Keypoint9>. (accessed 2013-10-20)
  26. Cunningham D., Atkin W., Lenz H.J., Lynch H.T., Minsky B., Nordlinger B., et al. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010;375:1030-1047.
  27. OMS, Cáncer Nota descriptiva (Febrero 2013) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
  28. Tirado G. L. y Mohar B. A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. *Gaceta Mexicana de Oncología;* 7 (4): 3-11.
  29. O'Keefe S.J. Ou J., Aufreiter S., O'Connor D., Sharma S., Sepulveda J., Fukuwatari T., Shibata K., Mawhinney T. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr.* 2009 Nov;139(11):2044-8.
  30. Aureli P., Capurco L., Castellazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G.V. (2011). Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research* 63 366–376
  31. Rafter J. (2004). The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr Res Rev* 2004;17: 277–284.
  32. Peitsidou, K., Karantanos, T., y Theodoropoulos, GE. (2012). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics: Is There Enough Evidence to Support, Their Use in Colorectal Cancer Surgery? *Disgestive Surgery;* 29:426 – 438.

33. Ning-Ping Foo, Chung-Keung Yu, Hui Ou Yang, Hsueh-Huei Chiu, y Ying-Jan Wand (2011). Probiotics Prevent the Development of 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colonic Tumorigenesis through Suppressed Colonic Mucosa Cellular Proliferation and Increased Stimulation of Macrophages. *Journal Agricultural Food Chemistry*; 59: 13337–13345.
34. Uccello, M., Malaguarnera, G., Basile, F., D'agata, V., Malaguarnera, M., Vacante, M., Drago, F., y Biondi, A. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery*; 12 (1): 35.
35. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495–516.
36. Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., y S.Reddy B. (1997). *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*; 18 (4): 833–841.
37. Cristobo I. (2008). Proteómica de expresión de placas de ateroma carotídeas. Tesis Doctoral. Universidade Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.
38. Ramos-Cormenaza, A., Monteoliva-Sánchez, M., y Nader-Macías, F.E. (2012). Probióticos y salud. España: Díaz de Santos.
39. Humphery I. y Blackstock W. (1997). Proteome Analysis: Genomics via the Output Rather Than the Input Code. *Journal of Protein Chemistry*; 16 (5).
40. Piatek J., Gibas-Dorna M., Olejnik A., Krauss H., Wierzbicki K., Zukiewicz-Sobczak W., Glowacki M. (2012). The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination-*in vitro* study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol 19, No 1, 99-102
41. Tuomola E.M. and Salminen S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol.* 5;41(1):45-51.
42. Rashmi R1, Kumar S, Karunagaran D. (2004). Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis*. Feb;25(2):179-87. Epub 2003 Nov 6.

43. UniProt <http://www.uniprot.org/> (consulta 20/12/2014)
44. Azuma K., Shichijo S., Takedatsu H., Komatsu N., Sawamizu H., Itoh K. (2003). Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. *Br J Cancer*. Sep 15;89(6):1079-85.
45. Hamelin C., Cornut E., Poirier F., Pons S., Beaulieu C., Charrier J.P., Haïdous H., Cotte E., Lambert C., Piard F., Ataman-Önal Y., Choquet-Kastylevsky G. (2011). Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS J*. 2011 Dec;278(24):4845-59. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08385.x. Epub. Nov 3.
46. Luo W., and Semenza G.L. (2012). Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab*. Nov;23(11):560-6. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.010. Epub 2012 Jul 21.
47. Hamabe A., Konno M., Tanuma N., Shima H., Tsunekuni K., Kawamoto K., Nishida N., Koseki J., Mimori K., Gotoh N., Yamamoto H., Doki Y., Mori M., Ishii H. (2014). Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 28;111(43):15526-31. doi: 10.1073/pnas.1407717111. Epub 2014 Oct 13.
48. Yang L., Xie M., Yang M., Yu Y., Zhu S., Hou W., Kang R., Lotze M.T., Billiar T.R., Wang H., Cao L., Tang D. (2014). PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat Commun*. 2014 Jul 14;5:4436. doi: 10.1038/ncomms5436.
49. Georges E., Bonneau A.M., Prinos P. (2011). RNAi-mediated knockdown of  $\alpha$ -enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011;2(4):303-8. Epub 2011 Oct 21.
50. Tang Z., Yuan S., Hu Y., Zhang H., Wu W., Zeng Z., Yang J., Yun J., Xu R., Huang P. (2012). Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. *J*

Bioenerg Biomembr. 2012 Feb;44(1):117-25. doi: 10.1007/s10863-012-9420-9.

51. Wang C.Y., and Lin C.F.. (2014). Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers*. 2014;2014:308976. doi: 10.1155/2014/308976.

52. Xing R., He H., He Y., Feng Y., Zhang C., Wu H., Sun M., Yu X., Liu Y., Song X., Wang X., Chen Y., Hou Y. (2013). ANXA2 remodels the microstructures of caco2 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2013 Feb 26;59 Suppl:OL1848-54.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Medio de cultivo MRS

Para 100 mL

Peptona	1g
Extracto de levadura	0.5g
Extracto de res	1g
Tween 80	0.1g
Citrato de amonio	0.2g
Acetato de sodio	0.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2g
MgSO <sub>4</sub>	10mg
MnSO <sub>4</sub>	5mg
Dextrosa	2g
Cisteína	50mg

Para prepararlo:

La peptona, los extractos y tween se colocan con 60mL de agua destilada. Aparte se coloca el citrato, el acetato, el fosfato y los sulfatos en 20mL de agua destilada. La dextrosa se coloca en 20mL de agua destilada y todo lo anterior se esteriliza.

La cisteína se disuelve en 5-3mL de agua estéril o bien se puede esterilizar por filtración y se coloca una haya bajado la temperatura de los anteriores compuestos. Todo se mezcla.

Para medio solido agregar 1.5g de agar por cada 100 mL.



## Anexo 2. PBS

Para 1L

KCl 200mg

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg

NaCl 8g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.16g

Ajustar pH a 7.4

### **Anexo 3. Solución de rehidratado urea-tiourea**

Para 10mL

Urea	7M
Tiourea	2M
Azul de bromofenol al 1%	20 $\mu$ L
CHAPS	0.2g

**Anexo 4. Identificación de proteínas diferencialmente acumuladas en las células de colon humano antes y después de la interacción con *Lactobacillus casei* Shirota**

Banda <sup>a</sup>	Proteína <sup>b</sup>	Organismo <sup>c</sup>	Núm. de acceso <sup>d</sup>	Peso E. <sup>e</sup>	Peso T. <sup>f</sup>	Score Mascot <sup>g</sup>	Cober. (%) <sup>h</sup>	Péptidos E. <sup>i</sup>	Péptidos <sup>j</sup>
CC-1	Heat shock cognate	Homo sapiens	P11142	70	71	457	25	16	K.LLQDFFNGK.E K.FELTGIPPAPR.G K.DAGTIAGLNVLR.I K.VEIIANDQGNR.T K.VEIIANDQGNR.T R.MVNHFIAEFK.R + Oxidation (M) R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.ARFEELNADLFR.G K.SQIHDIVLVGGSTR.I R.TTPSYVAFTDTER.L K.SFYPEEVSSMVLTK.M + Oxidation (M) K.NQVAMNPTNTVFDK.R R.IINEPTAAAIAYGLDK.K K.NQVAMNPTNTVFDK.R + Oxidation (M) K.NQVAMNPTNTVFDK.R + Oxidation (M) K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.STAGDTHLGGEDFDNR.M R.IINEPTAAAIAYGLDKK.V R.IINEPTAAAIAYGLDKK.V
	Stress-70 protein, mitochondrial	Homo sapiens	P38646	70	73.92	111	9	3	K.VQQTVDLFR.A R.AQFEGIVTDLIR.R R.TTPSVVAFTADGER.L K.LLGQFTLIGIPPAPR.G K.LLGQFTLIGIPPAPR.G

CC-2	Pyruvate kinase PKM	Homo sapiens	P14618	60	58.47	195	9	4	K.NAVITVPAYFNDSQR.Q K.ITLDNAYMEK.C R.LDIDSPPITAR.N K.ITLDNAYMEK.C + Oxidation (M) K.DPVQEAWAEDVDLR.V K.GADFLVTEVENGGSLGSK.K K.IPAMTIAK.N + Oxidation (M)
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Homo sapiens	P10800 9	60	61.18	162	13	3	R.TVIIEQSWGSPK.V R.GYISPYFINTSK.G K.ISSIQSIVPALEIANAHR.K K.LVQDVANNTNEEAGDGTATVLR.S R.SGKYDLDFK.S K.LMIEMDGTENK.S + Oxidation (M) R.GNPTVEVDLFTSK.G R.YISPDQLADLYK.S R.YISPDQLADLYK.S R.YISPDQLADLYK.S K.VVIGMDVAASEFFR.S + Oxidation (M)
CC-3	Alpha-enolase	Homo sapiens	P06733	50	47.48	276	29	6	K.VNQIGSVTESLQACK.L R.AAVPSGASTGIYEALR.D K.LAMQEFMILPVGAANFR.E + 2 Oxidation (M) K.LAMQEFMILPVGAANFR.E + 2 Oxidation (M) K.DATNVGDEGGFAPNILENK.E
	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	Homo sapiens	Q5VTE0	50	50.49	165	12	4	K.STTTGHLYK.C R.EHALLAYTLGVK.Q K.YYVTIIDAPGHR.D K.YYVTIIDAPGHR.D R.VETGVLKPGMVVTFAPVNVTTTEV K.S + Oxidation (M)
CC-4	Annexin A2	Homo sapiens	P07355	40	38.8	335	34	11	K.WISIMTER.S K.WISIMTER.S + Oxidation (M) R.DALNIETAIK.T K.TPAQYDASELK.A K.DIISDTSGDFR.K R.TNQELQEINR.V

Glyceraldehyd e-3-phosphate dehydrogenas e	Homo sapiens	P04406	40	36.2	11	12	2	K.DIISDTSGDFRK.L K.SLYYYIQQDTK.G K.SYSPYDMLESIR.K K.SYSPYDMLESIR.K + Oxidation (M) K.SYSPYDMLESIRK.E + Oxidation (M) K.TDLEKDIISDTSGDFR.K K.LSLEGDHSTPPSAYGSVK.A R.AEDGSVIDYELIDQDAR.D R.RAEDGSVIDYELIDQDAR.D R.VVDLMAHMASKE.- + 2 Oxidation (M) R.GALQNIIPASTGAAK.A K.LVINGNPITIFQER.D
---	-----------------	--------	----	------	----	----	---	--

<sup>a</sup>Número de la banda seleccionada de acuerdo al perfil proteómico, <sup>b</sup>Proteína(s) identificada(s) en la base de datos, <sup>c</sup>Organismo de origen de la proteína identificada, <sup>d</sup>Número de acceso en la base de datos del Swiss Prot, <sup>e</sup>Peso experimental de la proteína, <sup>f</sup>Peso teórico determinado por la base de datos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos, <sup>g</sup>Score reportado en Mascot después de la búsqueda en la base de datos, <sup>h</sup>Porcentaje de cobertura de la secuencia, <sup>i</sup>Numero de péptidos emparejados, <sup>j</sup>Secuencia de péptidos