

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA *Streptococcus bovis* EN  
PACIENTES CON CONDICIONES PRENEOPLÁSICAS EN COLON

Por

MC MERAB MAGALY RIOS LICEA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Enero, 2011

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por su guianza y fortaleza.

A mis padres y hermanos, por su amor y por estar conmigo en todo tiempo.

A mi familia espiritual, que siempre estuvo orando por mí.

Al Departamento de Microbiología, por abrirme sus puertas para realizar este proyecto.

A la Dra. Elvira Garza, por su asesoría, apoyo y por todo lo que hizo por mí para la realización de este proyecto, que trajo un crecimiento que más allá de convertirse en un investigador, fue una lección de vida.

A la Dra. Gloria González, por su asesoría y ayuda

Al Dr. Guillermo Pérez Pérez y a su esposa por la proporción de las muestras, por recibirme en su laboratorio y hacerme sentir como en casa.

A la Comisión de tesis por permitirme formar parte de este proyecto y por su apoyo en las correcciones de este escrito.

A mis compañeros, por su amistad y apoyo.

## **SITIO DE ESTUDIO**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, en colaboración con el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Universidad Autónoma de Nuevo León, y el Departamento de Medicina y Microbiología, VA Medical Center, Escuela de Medicina, Universidad de Nueva York.

Director de Tesis: Dra. Elvira Garza González

Co-director de Tesis: Dra. Gloria M. González González

Co-director de Tesis: Dr. Francisco J. Bosques Padilla

Comisión de Tesis: Dra. Ana M. Rivas Estilla

Comisión de Tesis: Dr. Carlos E. Medina de la Garza

## TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Cáncer colorrectal	1
1.2. Pólipos adenomatosos	2
1.3. Factores de mal pronóstico de un pólipo adenomatoso	2
1.4. Secuencia pólipo adenomatoso-carcinoma	4
1.5. Incidencia asociada a CCR	5
1.6. Mortalidad asociada a CCR	6
1.7. Estadios del CCR	7
1.8. Diagnóstico inicial del CCR	8
1.9. Manifestaciones clínicas de pólipos adenomatosos y CCR	8
1.10. Pruebas diagnósticas de pólipos adenomatosos y CCR	9
1.11. Colonoscopia y polipectomía	9
1.12. Tratamiento de los pólipos adenomatosos y CCR	10
1.13. Toma de biopsia	10
1.14. Fisiopatología y patogenia del CCR	11
1.14.1 Factores de riesgo	11
1.14.2 Microflora intestinal y CCR	12

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1.15. <i>Streptococcus bovis</i>	13
1.15.1 <i>Streptococcus bovis</i> y CCR	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos particulares	19
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
4.1. Estrategia general	20
4.2. Estandarización del ELISA	23
4.2.1. Preparación antigénica de <i>S. bovis</i>	23
4.2.1a. Cepa de estudio	22
4.2.1b. Preparación del antígeno	23
4.2.1c. Tinción de Gram	24
4.2.2. Extracción antigénica de <i>S. bovis</i>	24
4.2.3. Estandarización del SDS-PAGE	26
4.2.4. Producción de suero hiperinmune anti- <i>S. bovis</i>	27
4.2.5. Purificación antigénica de <i>S. bovis</i>	28
4.2.6. Estandarización del ELISA	28
4.2.7. Análisis de resultados del ELISA	30

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
4.3. Validación del ELISA	31
4.3.1. Población de estudio	31
4.3.2. Validación del ELISA	31
4.3.3. Curvas ROC	32
4.4. Aplicación de la prueba de ELISA	32
4.4.1. Población de estudio	32
4.4.2. Aplicación de la prueba de ELISA	33
4.5. Determinación del patrón de reactividad serológica frente a <i>S. bovis</i>	33
4.5.1. Estandarización del Western-blot	33
4.5.2. Western-blot	35
4.5.3. Análisis del Western-blot y evaluación como prueba diagnóstica	35
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. Estandarización del ELISA	37
5.1.1. Identificación bacteriana	37
5.1.2. Extracción antigénica de <i>S. bovis</i>	39
5.1.3. Producción de suero hiperinmune anti- <i>S. bovis</i>	40
5.1.4. Purificación antigénica de <i>S. bovis</i>	41
5.1.5. Estandarización del ELISA	42

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
5.2. Validación del ELISA	43
5.2.1. Población de estudio	43
5.2.2. Validación del ELISA	43
5.2.3. Curvas ROC	44
5.3. Aplicación de la prueba de ELISA	46
5.3.1. Población de estudio	46
5.3.2. Aplicación de la prueba de ELISA	46
5.4. Determinación del patrón de reactividad serológica frente a <i>S. bovis</i>	46
5.4.1. Estandarización del Western-blot	46
5.4.2. Western-blot	47
5.4.3. Análisis del Western-blot y evaluación como prueba diagnóstica	49
<b>6. DISCUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>60</b>
<b>10. APÉNDICES</b>	<b>66</b>
<b>A</b> Perfil bioquímico de identificación	
<b>B</b> Preparación de reactivos y soluciones	
<b>C</b> Procedimientos	

## LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Interpretación del Índice <i>Kappa</i> para determinar el grado de concordancia entre observadores.	36
<b>Tabla 2.</b> Caracterización bioquímica de la cepa de <i>S. bovis</i> ATCC 9808 utilizada mediante el sistema de identificación Rapid ID32 Strep System.	38
<b>Tabla 3.</b> Criterio diagnóstico correspondiente a la escala con valor de 1 al 6 y asignación de rangos de RDO.	44
<b>Tabla 4.</b> Pruebas diagnósticas y valores de sensibilidad/especificidad.	45
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la presencia de una banda proteica característica en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.	50
<b>Tabla 6.</b> Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 2 bandas proteicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.	50
<b>Tabla 7.</b> Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 3 bandas proteicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.	51
<b>Tabla 8.</b> Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 4 y 5 bandas proteicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.	52

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Clasificación histológica de los pólipos en colon.	1
<b>Figura 2.</b> Progresión del cáncer colorrectal.	2
<b>Figura 3.</b> Principales cánceres gastrointestinales reportados en los EUA.	5
<b>Figura 4.</b> Principales condiciones neoplásicas asociadas a mortalidad en México.	6
<b>Figura 5.</b> Estadios del cáncer colorrectal.	7
<b>Figura 6.</b> Estadios de la enfermedad al diagnóstico inicial de cáncer colorrectal.	8
<b>Figura 7.</b> Estrategia general.	22
<b>Figura 8.</b> Esquema de inmunización para obtener suero hiperinmune anti- <i>S. bovis</i> .	28
<b>Figura 9.</b> Perfiles proteicos de los preparados antigénicos totales.	40
<b>Figura 10.</b> Determinación de la presencia de anticuerpos anti- <i>S. bovis</i> por el método de doble difusión en placa.	41

<b>Figura 11.</b> Perfil de proteínas de la fracción antigénica seleccionada para validación del ELISA y perfil del extracto antigénico total del cual se extrajo.	43
<b>Figura 12.</b> Curva ROC de la prueba diagnóstica de pólipos adenomatosos.	45
<b>Figura 13.</b> Estandarización del Western-blot para determinar el patrón de reactividad serológica en seropositivos frente a la fracción antigénica de <i>S. bovis</i> .	47
<b>Figura 14.</b> Perfiles serológicos de seropositivos y pólipos adenomatosos frente a la fracción antigénica de <i>S. bovis</i> .	49

## NOMENCLATURA

°C	grados Celsius
μg	microgramo
μL	microlitro
ABC	área bajo la curva
AEBSF	4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoril clorhidrato
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albúmina sérica bovina
CCR	cáncer colorrectal
cm	centímetros
CRCEI	Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas
DAB	diamino bencidina
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
ELISA	Enzimo inmunoanálisis
g	gramo
h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazin-N'-[2-ácido etansulfónico])
IC	intervalo de confianza
IgG	inmunoglobulina G
k	índice <i>kappa</i>
K <sub>2</sub> CrO <sub>7</sub>	dicromato de potasio
kDa	kilodaltones
kg	kilogramo
L	litro

M	Molar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
n	número correspondiente al tamaño de la muestra
N	Normal
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	carbonato de sodio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	fosfato disódico anhidro
NaCl	cloruro de sodio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	fosfato monosódico
$\text{NaHCO}_3$	bicarbonato ácido de sodio
$\text{NaN}_3$	azida de sodio
$\text{NaNO}_3$	nitrato de sodio
nm	nanómetros
No	número
OD	densidad óptica
OR	odds ratio
PBS	buffer de fosfatos salino
PBSTT	buffer de fosfatos-Tween 20
PBSTTG	PBSTT-Gelatina
PBSTTGG	PBSTT-Gelatina-Gammablobulina
PM	peso molecular
PRP	peroxidasa de rábano picante
PVDF	polivinil dieno fluorado
RDO	razón de densidad óptica
ROC	curva de rendimiento diagnóstico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo

SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes
sub	subespecie
TMB	tetrametil bencidina
valor $p$	probabilidad
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo
$\lambda$	longitud de onda

## RESUMEN

MC Merab Magaly Rios Licea

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título:** Análisis de la respuesta inmune humoral contra *Streptococcus bovis* en pacientes con condiciones preneoplásicas en colon.

**Área de Estudio:** Microbiología Médica

**Antecedentes.** El cáncer colorrectal (CCR) representa un problema médico de gran magnitud a nivel mundial por la alta mortalidad asociada a esta neoplasia, principalmente en casos avanzados. Los datos epidemiológicos sugieren que en nuestro país este tipo de cáncer está en aumento, lo cual coincide con lo que está sucediendo a nivel mundial. *Streptococcus bovis* se ha implicado en endocarditis humana y se ha relacionado también con CCR. Sin embargo, aun no se ha determinado si tiene una relación causal con el cáncer, o si éste, como condición preexistente, permite el sobre crecimiento de la bacteria en el intestino grueso. Algunos estudios han mostrado una asociación entre la respuesta inmune contra *S. bovis* y la presencia de pólipos o CCR. Los estudios que se han hecho hasta el momento no tienen un sustento metodológico que permita obtener conclusiones definitivas. Adicionalmente, los estudios llevados a cabo hasta el momento se han realizado con cepas y especies diferentes debido a las reclasificaciones de *S. bovis* en la última década. Por lo que, en este trabajo, se hizo un análisis de la respuesta inmune humoral contra *S. bovis* en pacientes con condiciones preneoplásicas en colon para determinar si existe una asociación entre la bacteria y el cáncer.

**Material y métodos.** Para estandarizar una prueba de ELISA tipo no competitivo indirecto para determinación de anticuerpos séricos anti-*S. bovis*, se empleó una preparación antigénica de *S. bovis* biotipo I y se utilizó como control positivo un suero hiperinmune producido en conejo. Se incluyeron muestras de 155 pacientes sometidos a colonoscopia para validación de la prueba y de 383 pacientes de

una población con incidencia alta de CCR para su aplicación. Para validar y determinar la utilidad diagnóstica de la prueba de ELISA, se analizaron las curvas ROC de condiciones preneoplásicas y neoplásicas en colon; además, se determinó la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica y área bajo la curva (ABC). El ELISA fue aplicado en las muestras de la población con incidencia alta de CCR y mediante Western-blot se determinó si el patrón de reactividad serológica frente a los antígenos de *S. bovis* era característico en los seropositivos por ELISA, en búsqueda de posibles marcadores serológicos de la enfermedad.

**Resultados.** Se estandarizó una prueba de ELISA tipo no competitivo indirecto para determinación de anticuerpos séricos anti-*S. bovis*. La prueba fue validada en pacientes sometidos a colonoscopia; de los cuales, el 69% fue caracterizado con colon normal, 11% con pólipos no adenomatosos, 6% con pólipos adenomatosos y 14% con CCR. La prueba diagnóstica de pólipos adenomatosos mostró una sensibilidad y especificidad de 80 y 61% respectivamente, exactitud diagnóstica de 62 y ABC de 0.714; sin embargo, no mostró aplicación diagnóstica de pólipos adenomatosos de acuerdo al análisis. Se compararon los patrones de reactividad serológica de los seropositivos, con pólipos adenomatosos y colon normal, y no se observó un perfil característico entre ellos; sin embargo, en la mayoría de los seropositivos-seronegativos con pólipos adenomatosos, se observó un perfil de 5 proteínas de peso molecular (PM) entre 15 y 50kDa.

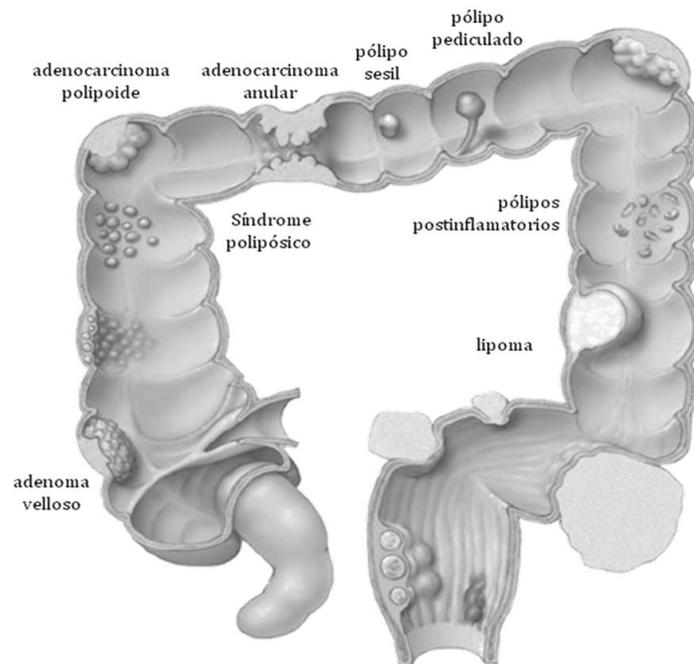
**Conclusiones.** La prueba de ELISA no es útil para el diagnóstico de lesiones preneoplásicas en colon. El Western-blot podría ser una herramienta no invasiva útil para la predicción de lesiones preneoplásicas de colon en la población. De acuerdo a los resultados, la infección por *S. bovis* está asociada con la presencia de lesiones preneoplásicas en colon.

# Capítulo 1

## 1. Introducción

### 1.1. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad en la que se presenta un crecimiento incontrolado de células anormales en el colon y/o recto. La mayoría de los CCR comienzan como pólipos no cancerosos que lentamente se van transformando en una neoplasia maligna. Los pólipos son tumoraciones o protuberancias circunscritas visibles macroscópicamente que se proyectan en la superficie de la mucosa del colon y no suelen presentar síntomas. Se clasifican histológicamente en: Pólipo neoplásico no epitelial, inflamatorio, hiperplásico y neoplásico epitelial (1,2). La Figura 1 muestra la clasificación histológica de los pólipos en colon.



**Figura 1.** Clasificación histológica de los pólipos en colon.

Los pólipos neoplásicos no epiteliales son: lipomas, neurofibromas y hemangiomas. Los pólipos inflamatorios son linfoides benignos. Los pólipos hiperplásicos no suelen ser malignos, y pueden ser precancerosos si se presentan en el colon derecho o ascendente. Los pólipos neoplásicos epiteliales son pólipos adenomatosos (1,2).

Según la forma de su crecimiento, los pólipos pueden ser pediculados o sésiles. Los pólipos pediculados tienen un tallo de implantación de 1.5 cm y están asociados a menor riesgo de malignidad porque la transformación maligna tarda en llegar a la base de sujeción. Los pólipos sésiles tienen una base de implantación amplia, sin tallo, de 2 cm e implican mayor malignidad porque la degeneración cancerosa llega antes a la base (2).

La mayoría de los casos de CCR derivan de pólipos adenomatosos, previamente benignos, y se localizan en colon y recto (2).

## **1.2. Pólipos adenomatosos**

Los pólipos adenomatosos constituyen una familia de neoplasias mucosas con diversidad de apariencia externa, pero que comparten características genéticas, fenotípicas y evolutivas esenciales. Se clasifican en: Tubular, túbulo veloso y veloso. Los adenomas velosos son más voluminosos que los adenomas tubulares y suelen ser sésiles en la mayoría de los casos. Por su histología y mayor volumen son los que poseen mayor potencial de malignidad. La prevalencia de los pólipos adenomatosos se ha estimado en 20 a 30% en estudios de poblaciones abiertas y en 40 a 60% en países desarrollados (3).

## **1.3. Factores de mal pronóstico de un pólipo adenomatoso**

Los pólipos adenomatosos son claramente premalignos. De acuerdo a la prevalencia e incidencia de CCR, aproximadamente el 12% de las personas tiene pólipos adenomatosos y un 25% de ellos son de alto riesgo (4). Los factores que determinan la transformación maligna de un pólipo adenomatoso son (5):

1. El tamaño del pólipo adenomatoso. Cuanto mayor sea el tamaño, mayor será la probabilidad de cáncer, siendo bajo (menor del 2%) en lesiones menores de 1.5 cm, intermedia (2 a 10%) en lesiones de 1.5 a 2.5 cm de tamaño y alta (10%) en lesiones mayores de 2.5 cm.
2. El tipo histológico, de tal forma que la probabilidad de transformación en un carcinoma es del 40% en un pólipo adenomatoso vellosos y del 5% en un pólipo adenomatoso tubular.
3. La presencia de displasia epitelial, que aumenta la probabilidad de que un pólipo se malignice. Se observan frecuentemente en la enfermedad inflamatoria intestinal.
4. Parámetros clínicos: Edad avanzada, historia familiar de poliposis, recidiva tras escisión local.
5. Parámetros morfológicos: Tamaño mayor de 2 cm, múltiples pólipos adenomatosos, pólipos adenomatosos vellosos y tiempo de evolución (6).

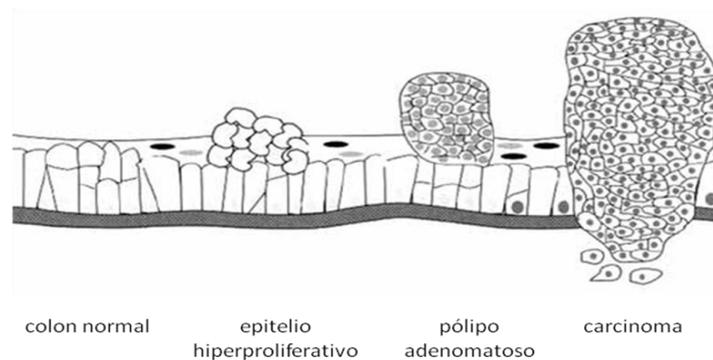
Se desconoce el mecanismo por el que un pólipo adenomatoso se transforma en carcinoma. La evidencia sugiere que es precisa la activación de oncogenes por mutaciones que promueven la proliferación alterada de la mucosa del colon, seguida de la pérdida de genes que suprimen la génesis tumoral (6). El tiempo necesario para que se produzca la transformación pólipo adenomatoso-carcinoma es superior a los 5 años, con una media entre 10 y 15 años (6).

#### **1.4. Secuencia pólipo adenomatoso-carcinoma**

A nivel microscópico, el colon posee criptas que tienen una profundidad aproximada de 50 células (7). En el colon no es necesaria una superficie extensa, ya que se reabsorbe sólo agua. En el epitelio sano del colon se produce una renovación casi constante y normal del epitelio superficial, aproximadamente cada seis días, mediante proliferación celular y diferenciación de

las células de la cripta. La proliferación de los enterocitos se lleva a cabo en la porción inferior de la cripta, y se caracteriza por sufrir mitosis y porque las células del colon migran hacia la parte superior de la cripta, alejándose de las células madre. La diferenciación y la maduración de las células nuevas se llevan a cabo a medida que éstas suben a lo largo de la cripta. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse de nuevo, mueren por apoptosis y se desprenden hacia la luz intestinal. En el pólipo adenomatoso, esta secuencia está alterada. Ocurre una mitosis continua y las células no sufren diferenciación, de manera que el compartimento donde proliferan puede llegar a ocupar la cripta completa (7).

La mayoría de los tumores colorrectales son adenocarcinomas, que se originan a partir de pólipos adenomatosos desarrollados en la mucosa del colon. Esta secuencia adenoma-carcinoma se origina tras una serie de acontecimientos clínico-histopatológicos bien caracterizados, con los que se han asociado alteraciones genéticas moleculares. La Figura 2 muestra la progresión de un epitelio normal a CCR.

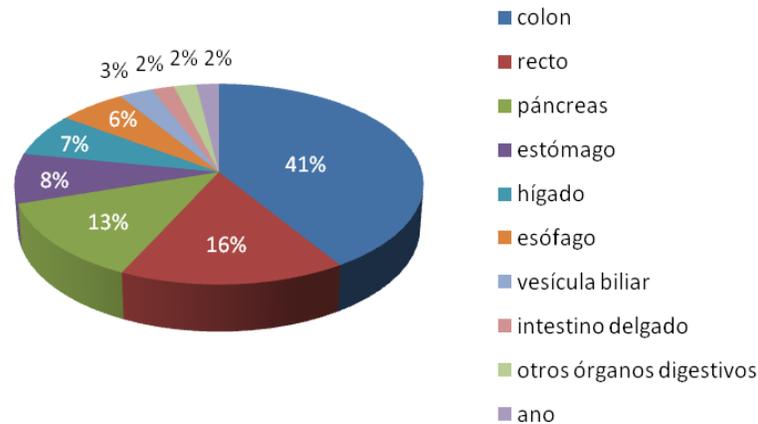


**Figura 2.** Progresión del cáncer colorrectal.

### 1.5. Incidencia asociada a CCR

El CCR representa el cáncer del sistema digestivo más frecuentemente diagnosticado, y representa el 41% de los casos nuevos esperados (8).

La Figura 3 muestra los porcentajes de los cánceres gastrointestinales más frecuentemente diagnosticados en los Estados Unidos de América (EUA).



**Figura 3.** Principales cánceres gastrointestinales reportados en los EUA.

El CCR es una malignidad común en países desarrollados (9). Es el tercer cáncer más incidente a nivel mundial en hombres, después del cáncer de pulmón y el de próstata, y el segundo en mujeres, tras el cáncer de mama (10). Las tasas de incidencia más altas se encuentran en Oceanía y EUA (tasas ajustadas (TA) entre 46,5 y 48,3 casos por 100.000 habitantes (11), y las tasas más bajas se encuentran en Asia, África y Sudamérica (TA entre 10,5 y 12,8).

El CCR está emergiendo como un problema de salud pública, y es cada vez más frecuente en el mundo occidental (11). La diferencia con respecto a los países subdesarrollados es de 4 a 1 (11, 12). La alta incidencia del CCR en el mundo occidental es debida tanto a factores ambientales, fundamentalmente la dieta rica en grasas y proteínas y pobre en fibra y vegetales, como al progresivo envejecimiento de la población (13). Las tasas de CCR son más altas en hombres que en mujeres (11).

### 1.6. Mortalidad asociada a CCR

En los EUA, la incidencia de los cánceres gastrointestinales ha disminuido; sin embargo, se ha presentado un incremento significativo en la mortalidad asociada a CCR (10). En los países desarrollados, la mortalidad es cercana al 50% mientras que en los países en vías de desarrollo es del 80% (10). En México, se ha reportado que el CCR se encuentra entre las 10 principales condiciones neoplásicas asociadas a riesgo de mortalidad (14), tal como se muestra en la Figura 4.



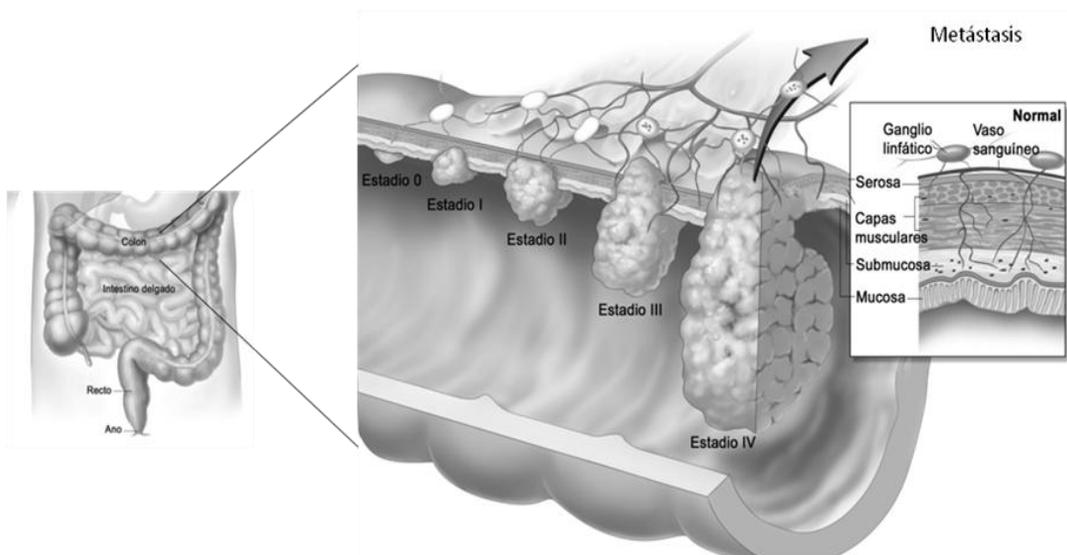
**Figura 4.** Principales condiciones neoplásicas asociadas a mortalidad en México.

### 1.7. Estadios del CCR

El CCR se divide en estadios, según el grado de invasión de la pared del colon, invasión de ganglios, órganos adyacentes y metástasis a distancia.

En el estadio 0, el cáncer se encuentra sólo en el revestimiento más interno del colon o recto, llamado también carcinoma *in situ*. En el estadio I, el cáncer ha crecido dentro de la pared interior del colon o recto y no se ha extendido fuera del colon. En el estadio II, el tumor se extiende con más profundidad dentro de la pared del colon. Es posible que haya invadido tejido

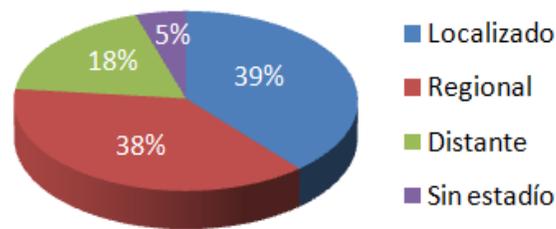
cercano, pero las células cancerosas no se han diseminado a los ganglios linfáticos. En el estadio III, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos. En el estadio IV, el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como a hígado o pulmones (15). La Figura 5 muestra los estadios del CCR.



**Figura 5.** Estadios del cáncer colorrectal.

### 1.8. Diagnóstico inicial del CCR

El CCR tiene un período largo asintomático y cuando se detecta en un estadio temprano y es localizado, la supervivencia a los 5 años es de 90% después de una resección quirúrgica del tumor; sin embargo, solo el 40% de los cánceres colorrectales se diagnostican en este estadio (16). Después de que el cáncer se ha diseminado a órganos adyacentes o nódulos linfáticos, la supervivencia a los 5 años es del 68%. Para personas con metástasis distante, la supervivencia a los 5 años es del 10% (8). La Figura 6 muestra los porcentajes de los estadios de la enfermedad al diagnóstico inicial del CCR (17).



**Figura 6.** Estadios de la enfermedad al diagnóstico inicial de CCR.

### 1.9. Manifestaciones clínicas de pólipos adenomatosos y CCR

La mayoría de los pólipos en colon son asintomáticos. Algunos pólipos adenomatosos pueden sangrar, en menos del 5% de los pacientes con pólipos se puede encontrar sangre oculta en heces. Si son grandes y pediculados pueden provocar dolor o alteraciones de la motilidad con diarrea. El pólipo adenomatoso vellosos puede producir gran cantidad de moco que es eliminado (18). Si la pérdida es continua y abundante provoca una pérdida abundante de potasio, lo que genera hipokalemia, a la que suelen añadirse hiponatremia e hipocloremia.

El CCR no suele dar síntomas hasta fases avanzadas y cuando aparecen, los síntomas y signos son variables e inespecíficos. Los síntomas más frecuentes incluyen: Diarrea, estreñimiento y/o tenesmo, hemorragia rectal, cambios en las defecaciones, pérdida de peso, cansancio, náuseas, vómitos y dolor abdominal (19). La presencia de síntomas notables o la forma en que se manifiestan depende del sitio del tumor y la extensión de la enfermedad (14).

### 1.10. Pruebas diagnósticas de pólipos adenomatosos y CCR

Los pólipos en colon se suelen detectar por colonoscopia o enema opaco. Al detectar un pólipo adenomatoso, debe estudiarse todo el intestino grueso, ya que en un tercio de los casos hay lesiones coexistentes. La colonoscopia debe realizarse periódicamente, incluso si no se

demonstró malignidad, ya que estos pacientes tienen una probabilidad de un 30 a un 50% de presentar otro pólipo adenomatoso, y su riesgo de padecer CCR es superior a la media. La colonoscopia debe realizarse cada 3 años (20). Otros procedimientos son el examen de sangre oculta en heces (FOBT), examen digital del recto, enema de bario y sigmoidoscopia (21).

### **1.11. Colonoscopia y polipectomía**

Los estudios de cohorte indican que la colonoscopia y la polipectomía previenen el 80% de los cánceres colorrectales, aunque son procedimientos invasivos que representan importantes riesgos y molestias para el paciente (22). La demostración de que el pólipo adenomatoso precede al desarrollo del CCR proviene del National Polyp Study Workgroup de los Estados Unidos, que evaluó la eficacia de la polipectomía. En estos estudios, el riesgo de presentar CCR en los individuos con pólipos adenomatosos en colon tratados mediante polipectomía endoscópica fue significativamente inferior al de los pacientes del grupo control a quienes no se practicó esta exploración (23). Además de demostrar el carácter premaligno de los pólipos adenomatosos, este estudio indica que la polipectomía endoscópica constituye la estrategia más eficaz para la prevención del CCR (24).

### **1.12. Tratamiento de los pólipos adenomatosos y CCR**

La cirugía es el principal tratamiento del CCR, requiere la extirpación quirúrgica del tumor y tejido cercano del colon o recto y nódulos linfáticos cercanos. Se debe extirpar todo tipo de pólipo porque representan un riesgo potencial para el desarrollo de CCR. Si el pólipo adenomatoso es menor a 1 cm, tiene bajo riesgo de malignidad, por el contrario, si mide más de 2 cm, ya puede haber degenerado. Si los pólipos son mayores de 1 cm, se extirpan vía endoscópica. Se utilizan las técnicas de resección por vía endoanal o vía posterior transesfinteriana para los pólipos adenomatosos vellosos malignizados que no han sobrepasado la capa muscular (24).

Diversos estudios de casos y controles y de cohortes, así como un reciente meta análisis, indican que el seguimiento intencionado tras la resección del tumor mejora el pronóstico de estos pacientes (25). Ello se debe a un aumento en la proporción de recidivas detectadas en fases asintomáticas y susceptibles de tratamiento con pretensión curativa, lo que se traduce en un incremento de la supervivencia de estos pacientes.

### **1.13. Toma de biopsia**

La patología del tumor de colon se reporta por lo general del análisis de tejido obtenido de una biopsia. El reporte patológico usualmente contiene una descripción del tipo de célula y el grado de avance. El tipo más común de célula neoplásica es el adenocarcinoma. Otros tipos menos frecuentes incluyen los linfomas y el carcinoma de célula escamosa. El diagnóstico de la biopsia generalmente suele ser definitivo y del que depende el tratamiento junto con el diagnóstico de extensión.

### **1.14. Fisiopatología y patogenia del CCR**

#### **1.14.1. Factores de riesgo**

Desde un punto de vista epidemiológico, el CCR puede clasificarse en función de los factores de riesgo asociados (26). El CCR se presenta según uno de estos tres modelos: hereditario, familiar y esporádico.

Menos del 10% de pacientes tienen una predisposición hereditaria (27) al CCR y estos casos se dividen en dos categorías, si hay presencia o ausencia de poliposis. Las enfermedades con poliposis: poliposis adenomatosa familiar (PAF) y los síndromes de poliposis hamartomatosa (síndrome de Peutz-Jeghers, poliposis juvenil) y sin poliposis: Cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (CCHNP, Síndrome de Lynch) (28). Los factores hereditarios pueden determinar la susceptibilidad del individuo a padecer adenomas y CCR, mientras que los factores ambientales,

probablemente, determinan que individuos, de los predispuestos genéticamente, desarrollen adenomas (pequeños, grandes) y finalmente, CCR (27).

El CCR familiar se presenta hasta en el 25% de casos. Los pacientes afectados tienen una historia familiar de CCR, pero el modelo no coincide con ninguno de los síndromes hereditarios descritos previamente. Estas familias tienen un riesgo aumentado de desarrollar CCR, aunque el riesgo no sea tan alto como en los de predisposición hereditaria. Tener un familiar de primer grado afectado (padre, hermano, hijo) aumenta el riesgo de desarrollar CCR un 1.7% respecto a la población general (29). El riesgo es mayor si existen dos familiares de primer grado con CCR o si se presenta antes de los 55 años de edad.

La enfermedad esporádica, en la cual no hay historia familiar, representa hasta el 85% de todos los cánceres colorrectales (30, 31). En la etiología están implicados factores ambientales y genéticos, tales como: la edad ( $\geq 50$  años), ya que más del 90% de los casos son diagnosticados en esta edad (32), tabaquismo, presencia de pólipos colorrectales, antecedentes personales de cáncer (colon, ovario, endometrio, mama), antecedentes de colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn y el estilo occidentalizado de vida, el cual está caracterizado por dietas altas en calorías, ricas en grasas y azúcares refinados y proteínas animales, combinado con una ingesta baja de frutas y vegetales y una baja actividad física (33, 34). Los factores de la dieta son los factores que han sido asociados con mayor frecuencia (35).

#### **1.14.2. Microflora intestinal y CCR**

Se estima que más del 15% de los cánceres se atribuye a infecciones (36) o cerca de 1.2 millones de casos por año. Las infecciones que incluyen virus, bacterias y esquistosomas han sido relacionadas con cánceres de alto riesgo de malignidad (37). Aunque las infecciones virales han sido fuertemente asociadas con cánceres (38), las asociaciones bacterianas son significativas.

El intestino humano contiene una larga y dinámica población bacteriana que no sólo es esencial para la salud intestinal (39), sino tiene una participación crítica en el desarrollo de enfermedades, incluyendo fallo múltiple en órganos, enfermedad inflamatoria intestinal y CCR

(40). Aunque las infecciones bacterianas no se consideran como la principal causa de cáncer, evidencias sugieren que las bacterias puede inducir o promover el cáncer por el mecanismo de inflamación, o bien, por la presencia de componentes celulares bacterianos específicos que dan a la bacteria características carcinogénicas. Con respecto a esto, *Helicobacter pylori* fue la primer bacteria que fue identificada como causa definitiva de cáncer gástrico (41); además, ha sido relacionada con linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (42). Otras especies asociadas con cáncer son *Salmonella typhi* y cáncer de vesícula biliar (43) y *Chlamydothila pneumoniae* con cáncer de pulmón (44). Algunas especies bacterianas han sido asociadas a infecciones crónicas en colon y a un riesgo incrementado de CCR, incluyendo *Escherichia coli* (45) y algunos estreptococos (46) como *Streptococcus bovis* (47).

#### **1.15. *Streptococcus bovis***

*S. bovis* son cocos Gram positivos asociados en cadenas, no esporulados, inmóviles, catalasa negativo, no crecen en NaCl al 6.5%, no produce hemólisis en agar sangre de carnero al 5%, manitol positivo, amilasa positivo y pertenece al grupo D de Lancefield. *S. bovis* puede detectarse en el tubo gastrointestinal en solo 10% de la población humana (48) y se clasifica en 2 biotipos.

La mayoría de las cepas de *S. bovis* biotipo I producen glucanos extracelulares derivados de la sacarosa, fermentan el manitol e hidrolizan el almidón, a diferencia de las cepas biotipo II, que generalmente son negativas para esas pruebas (49).

Aunque *S. bovis* es considerado un patógeno oportunista de bajo grado (48), ocupa el segundo sitio en el grupo de los estreptococos como causante de endocarditis infecciosa (50), y se ha asociado con lesiones gastrointestinales, principalmente CCR (51). En adición, se ha reportado que el índice de carga fecal de *S. bovis* se incrementa ~5 veces en pacientes con CCR, lo cual sugiere que los tumores en colon constituyen un sitio de colonización preferencial para esta bacteria (52).

La presencia de bacteriemia o endocarditis por *S. bovis* son consideradas indicaciones clínicas para una colonoscopia, ya que estudios han reportado que hasta el 80% de los pacientes con endocarditis o bacteriemia por *S. bovis* presentaron tumores en colon (53). Algunos estudios han correlacionado la enfermedad con el biotipo infectante (49). Se ha reportado una asociación entre la presencia de cáncer gastrointestinal base y bacteriemia causada por *S. bovis* biotipo I y II, ya que el 71% de los pacientes con bacteriemia por *S. bovis* biotipo I presentaron lesiones en colon premalignas o malignas. En contraste, *S. bovis* biotipo II fue relacionado a lesiones en colon en solo 17% de los casos. De manera similar, la relación entre bacteriemia y la presencia de endocarditis fue de 94% con *S. bovis* biotipo I y solo 18% con *S. bovis* biotipo II (54).

La asociación del biotipo I con las neoplasias colorrectales y endocarditis sugiere un posible mecanismo de adherencia biotipo-específico. Se ha sugerido que las alteraciones en las condiciones locales y la disrupción de los canales capilares en el sitio de la neoplasia le permiten a *S. bovis* proliferar y entrar en la circulación sanguínea, otros estudios indican que las infecciones genitourinarias o dentales actúan como posibles fuentes de entrada (55). El mecanismo de asociación entre *S. bovis* y el CCR, así como la vía de entrada y la presentación clínica primaria, son datos aun desconocidos.

#### **1.15.1. *Streptococcus bovis* y CCR**

En 1951, McCoy y Mason (56) sugirieron una relación entre el CCR y la presencia de endocarditis infecciosa, pero fue hasta 1974 (52) que fue reconocida la asociación de *S. bovis* con las neoplasias colorrectales, ya que los pacientes presentaban tumores en colon más de 2 años después de la infección inicial. Esta asociación ha sido determinada en un 18% a 62% de los casos (57).

En 1993, Darjee y Gibb realizaron un estudio serológico para determinar si había un incremento en el título de anticuerpos contra *S. bovis* en pacientes con CCR y si podría ser utilizado como un marcador serológico de la presencia de esta neoplasia (58). Se emplearon sueros de 16

pacientes y de 16 controles pareados por edad y fueron probados por inmunoblot y ELISA contra preparaciones antigénicas crudas de 2 cepas de *S. bovis* (biotipo I y II) y una cepa de *Enterococcus faecalis*; sin embargo, no hubo diferencia entre los pacientes con cáncer y los controles empleando inmunoblot. El ELISA mostró un incremento en el título de anticuerpos contra las cepas probadas, por lo que los autores concluyeron que es posible desarrollar una prueba para detección de CCR basado en la detección de anticuerpos contra *S. bovis* o *E. faecalis*.

Se ha demostrado que *S. bovis* o los antígenos extraídos de su pared (WEA: wall extracted antigens) son capaces de promover la carcinogénesis en ratas (55). Un total de 10 ratas adultas recibieron dosis vía intraperitoneal del carcinógeno azoximetano (AOM) (15mg/kg de peso) una vez por semana por 2 semanas. 15 días después de la última dosis de AOM (semana 4), las ratas fueron separadas en 3 grupos. Dos veces por semana, por 5 semanas, las ratas recibieron por vía oral, *S. bovis* (Grupo I:  $10^{10}$  bacterias), WEA (Grupo II: 100µg) y controles (Grupo III). Una semana después de la última dosis (semana 10), los autores encontraron que la administración de la bacteria o sus antígenos promovieron la progresión de lesiones preneoplásicas. Hubo un incremento en la formación de criptas aberrantes hiperproliferativas en colon, se potenció la expresión de marcadores de proliferación y una producción elevada de IL-8 en la mucosa de colon. Las ratas normales tratadas con la bacteria no desarrollaron criptas hiperplásicas. Los autores concluyeron que *S. bovis* ejerce su actividad patológica en la mucosa del colon solo cuando las lesiones preneoplásicas están establecidas.

Bajo las mismas condiciones experimentales, *Streptococcus gordonii* fue sustituido por *S. bovis*. El número de lesiones preneoplásicas en el colon de ratas tratadas con *S. gordonii* fue similar a las ratas tratadas solo con AOM. Los autores sugieren que *S. bovis* y los antígenos de su pared, a diferencia de *S. gordonii*, actúan como promotores de carcinogénesis en un modelo animal químicamente inducido.

La heterogeneidad de los estreptococos del Grupo D de Lancefield fue objetivo de estudio en el 2004 (59), para establecer una caracterización fenotípica a nivel de especies y definir su posición filogenética, en vista de la potencial participación de *S. bovis* en el desarrollo de CCR.

Se realizaron estudios fisiológicos y análisis genómicos en 84 cepas representativas de los estreptococos del Grupo D y se determinaron sus características antigénicas y bioquímicas (60, 61). Los cambios en la clasificación permitieron la identificación de los biotipos de *S. bovis* asociados a neoplasias colorrectales, clasificados como *S. gallolyticus* (biotipo I) y *S. infantarius* (biotipo II/1) así como la descripción de nuevas especies.

En base al estudio de Darjee y Gibb, en el 2006, Tjalsma y cols. (62) determinaron la importancia clínica de la asociación de *S. bovis* con CCR, mediante el desarrollo de un ensayo de espectrometría de masas con inmunocaptura para generar perfiles proteicos, mediante la captura de antígenos específicos por anticuerpos séricos de pacientes con CCR. Este ensayo demostró que los perfiles antigénicos de *S. bovis* pudieron distinguir 11 de 12 pacientes con CCR de 8 sujetos sanos empleados como controles, en los que los perfiles antigénicos derivaron de *Escherichia coli*. Los perfiles antigénicos de *S. bovis* fueron detectados en pacientes con pólipos, por lo que los autores sugieren que la infección con esta bacteria podría presentarse en fase temprana durante la carcinogénesis. En los perfiles de *S. bovis* se identificó una proteína de unión a la heparina, que se encuentra en la superficie de la pared bacteriana (HlpA), por lo que los investigadores sugieren que esta proteína podría estar involucrada en el anclaje de *S. bovis* a las células tumorales.

Se ha sugerido que el establecimiento de una infección bacteriana depende de la conexión entre las adhesinas bacterianas y las estructuras de superficie del hospedero, que involucra además, competencia microbiana y procesos mecánicos dentro del tubo gastrointestinal. En adición, se ha sugerido que proteoglicanos (HSPGs) presentes en las células epiteliales del intestino son el blanco de adhesión e internalización de *S. bovis* biotipo I; y que además, están involucrados en la translocación bacteriana a través de la barrera del epitelio intestinal. En base a esto, Tjalsma y cols., en el 2009, determinaron la función de la proteína HlpA en la adherencia de *S. bovis* biotipo I a células de adenocarcinoma en colon (63). Se realizó un análisis SDS-PAGE de un lisado celular de células completas de *S. bovis* biotipo I, después de una incubación con heparina. Se observó un perfil de 7 proteínas no identificadas de unión a la heparina, por lo que se demostró que la HlpA es la principal proteína de unión a la heparina en la superficie

bacteriana; sin embargo, su contribución en la adherencia a las células tumorales en colon no ha sido resuelta.

La detección temprana de CCR o la identificación de individuos en riesgo es uno de los objetivos principales contra esta enfermedad. La asociación de *S. bovis* con CCR podría conducir al desarrollo de una herramienta diagnóstica para la identificación de individuos con estadios tempranos de CCR. Después de lo reportado por Darjee y Gibb en 1993, no hay estudios serológicos que exploren esta asociación.

## Capítulo 2

### 2. Justificación

A nivel mundial, se estima que alrededor del 15% de los cánceres desarrollados en humanos se asocia a infecciones. Hasta ahora, la participación de algunos agentes infecciosos es clara; sin embargo, la asociación de *S. bovis* en el desarrollo de neoplasias de colon es motivo de controversia.

Los estudios llevados a cabo hasta el momento no confirman una asociación de *S. bovis* con CCR, ya que: a) Se han realizado con especies/biotipos diferentes, b) se han utilizado preparaciones antigénicas crudas, c) han incluido un número reducido de pacientes y d) se han incluido controles sin tomar en cuenta las características histológicas del colon.

Por lo tanto, determinar si la respuesta inmune humoral frente a los antígenos de *Streptococcus bovis* se asocia con la presencia de condiciones preneoplásicas en colon podría conducir al desarrollo de una herramienta diagnóstica para la identificación de individuos con estadios tempranos de CCR y contribuir al conocimiento del desarrollo de la enfermedad asociado con agentes infecciosos.

## Capítulo 3

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Determinar si la respuesta inmune humoral frente a los antígenos de *Streptococcus bovis* se correlaciona con la presencia de condiciones preneoplásicas en colon.

#### 3.2. Objetivos particulares

1. Estandarizar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra *Streptococcus bovis* biotipo I en muestras de pacientes con condiciones preneoplásicas en colon.
2. Validar el ensayo de ELISA como prueba diagnóstica predictiva de CCR en pacientes sometidos a colonoscopia.
3. Aplicar la prueba validada en una población con incidencia alta de CCR.
4. Determinar el patrón de reactividad serológica frente a los antígenos de *S. bovis* en pacientes seropositivos por ELISA.

## Capítulo 4

### 4. Material y métodos

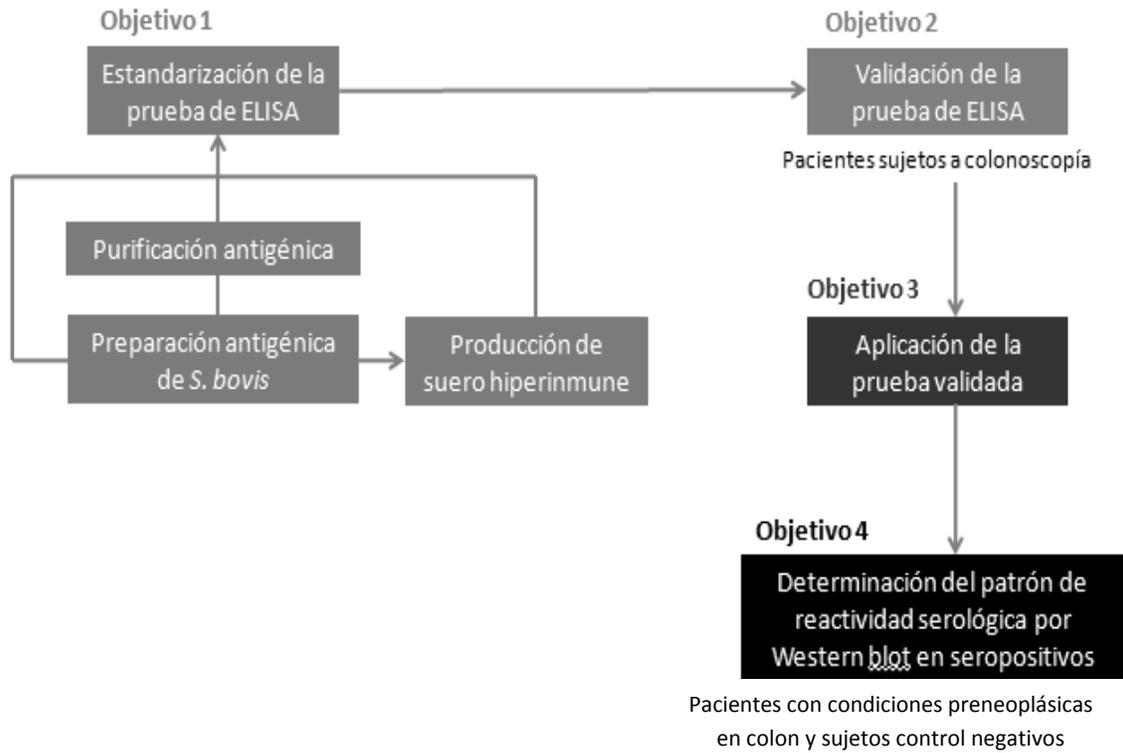
#### 4.1. Estrategia general

Para determinar si la respuesta inmune humoral frente a los antígenos de *Streptococcus bovis* se asocia con la presencia de condiciones preneoplásicas en colon, se siguió la estrategia general que se muestra en la Figura 7.

Se identificó la población de pacientes con condiciones preneoplásicas en colon tomando en cuenta los criterios de inclusión. Se solicitó consentimiento informado y se llevó a cabo la obtención de una muestra de sangre coagulada para obtener el suero, y la toma de una biopsia colorrectal, en caso de detectar la presencia de lesiones preneoplásicas o neoplásicas en colon. Esto se realizó en colaboración con el personal del Servicio de Gastroenterología y Medicina Interna del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Los sueros fueron procesados en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) de la Facultad de Medicina de la UANL, y las biopsias fueron enviadas al Departamento de Patología del Hospital Universitario para su análisis histológico y diagnóstico definitivo.

Para determinar si la respuesta inmune humoral frente a los antígenos de *S. bovis* se asocia con la presencia de condiciones preneoplásicas en colon, se estandarizó un ELISA no competitivo indirecto, al determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*S. bovis* en los sueros de los pacientes. Se hizo una preparación antigénica purificada a partir de células completas de *S. bovis* biotipo I, para lo cual, se utilizó como control positivo un suero hiperinmune producido en conejo. Para la estandarización se ajustaron las concentraciones del extracto antigénico bacteriano, concentración de suero control y del anticuerpo anti-IgG empleado como conjugado. La prueba de ELISA fue validada mediante la elaboración de curvas de rendimiento diagnóstico o curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic curves), y se definió el

punto de corte para clasificar a los pacientes como seropositivos o seronegativos. Con los resultados obtenidos de la colonoscopia y diagnóstico anatomopatológico de la biopsia, se obtuvo el status de infección de cada paciente, el cual fue correlacionado con los resultados del ELISA. A partir de los cuales, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica, para determinar la utilidad del ELISA como prueba predictiva de CCR. Posteriormente, la prueba fue aplicada en una población con incidencia alta de CCR, y en los seropositivos por ELISA se determinó mediante Western-blot si el patrón de reactividad serológica frente a los antígenos de *S. bovis* era característico, en búsqueda de posibles marcadores serológicos de la enfermedad.



**Figura 7.** Estrategia general para determinar si la respuesta inmune humoral frente a los antígenos de *Streptococcus bovis* se asocia con la presencia de condiciones preneoplásicas en colon.

## **4.2. Estandarización del ELISA**

### **4.2.1. Preparación antigénica de *S. bovis***

#### **4.2.1a Cepa de estudio**

La cepa bacteriana empleada en este estudio fue *S. bovis* ATCC 9809, la cual fue proporcionada por el Dr. Guillermo Pérez Pérez de la Universidad de Nueva York. La cepa fue cultivada en agar sangre de carnero y las placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> (Water Jacketed Incubator CI-46, Model 3546 S/N, American Scientific Products, E.U.), durante 24-48 h.

A partir del cultivo puro se realizó el perfil bioquímico para confirmar la identificación y biotipo bacteriano, empleando el sistema rapid ID32 Strep System (BioMérieux, Hazelwood, E.U.); para lo cual, se preparó una suspensión bacteriana en 2 mL de agua destilada estéril y se ajustó la turbidez al tubo 4 de McFarland. A partir de la suspensión se reconstituyeron los medios de la galería API, al inocular 55 µL de la suspensión en cada microtubo. La galería fue incubada a 37 °C durante 4 h. La lectura de las reacciones se hizo con ayuda de tablas de identificación, y el reconocimiento se realizó con ayuda de un software de identificación apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>)

#### **4.2.1b Preparación del antígeno**

Para la preparación del antígeno, se inoculó un medio infusión cerebro-corazón (BHI) (BIOXON, México) suplementado con 1% de glucosa (BBL, Division of BioQuest, Cockeysville, Maryland, E.U.) con la cepa de estudio, y se incubó a 37 °C durante 18 h (Incubadora modelo Napco 322-10, Heinicke Company Industrial and Laboratory Heater, Portland, Oregon, EE.UU.), bajo condiciones anaeróbicas, mediante la adición de aceite mineral estéril. El cultivo se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min, para eliminar el aceite mineral.

A partir de los sedimentos se hizo la extracción de los antígenos bacterianos, y previo a la extracción, se verificó su pureza mediante una tinción de Gram.

#### **4.2.1c Tinción de Gram**

Para evaluar la pureza del sedimento bacteriano se realizó una tinción de Gram. Se tomó una alícuota de cada tubo y se hicieron extensiones en portaobjeto. Se examinaron al microscopio de luz con objetivo 100X. La evaluación microscópica se centró en determinar la presencia única de cocos Gram positivos asociados en cadenas, para posteriormente realizar la extracción de los antígenos bacterianos.

#### **4.2.2.Extracción antigénica de *S. bovis***

Para la extracción antigénica de *S. bovis* se probaron 10 soluciones de lisis empleadas en métodos de extracción ya reportados con el objetivo de seleccionar la solución con la que se obtuviera el mayor rendimiento de proteínas con amplio rango de peso molecular. El sedimento de 10 mL de cultivo de *S. bovis* fue resuspendido en 1 mL de cada solución de lisis como se muestra a continuación:

1. Se empleó la solución de lisis del método reportado por Boissinot en 1987 (64) para extracción de proteínas totales, en el cual se utilizan sales para evitar la interferencia de lípidos: PBS 0.5M pH 7.3 (Productos Químicos Monterrey, México), Tris 1M pH 6.8 (USBiological, Swampscott, E.U.), sarkosil al 1% (Sigma-Aldrich, E.U.), como inhibidor de proteasas el 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil-fluoril-clorhidrato 0.1mM (AEBSF) (Sigma-Aldrich, E.U.), y como agente reductor el ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, E.U.).
2. Como variación del método reportado por Boissinot, se hizo una incubación posterior con lisozima a 37 °C por 30 min para aumentar la lisis celular.
3. En base al método reportado por González Sosa en el 2002 (65), se empleó una solución hipotónica para extracción de proteínas totales mediante lisis osmótica: HEPES 10mM pH 7.4 (ICN Biomedicals, E.U.), Tris 1M pH 6.8 (USBiological, E.U.), EDTA 10mM (Bio Basic INC, Canadá), sarkosil 1%, AEBSF-DTT 0.1mM.

4. Como variación del método reportado por González Sosa, se hizo una incubación posterior con lisozima a 37 °C por 30 min para aumentar la lisis celular.
5. Con el método reportado por Bogart en el 2005 (66), se hizo una extracción mecánica de proteínas, basada en la generación de ácido nitroso, mediante el cual se facilita la exposición y posterior extracción de antígenos totales del microorganismo: Ácido acético 1M (DEQ, SA de CV), NaNO<sub>3</sub> 0.5M (Productos Químicos Monterrey), EDTA 100mM, AEBSF-DTT 0.1mM.
6. Se realizó la extracción de proteínas totales con un solvente orgánico: 1 mL de acetona (CTR Scientific, Mty., México), SDS al 1% (Research Organics, E.U.), AEBSF-DTT 0.1mM.
7. De acuerdo al método reportado por Schöller en 1985 (67), se hizo una extracción de proteínas totales mediante la adición de sales: PBS/HEPES 10Mm pH 7.4, EDTA 10Mm, AEBSF-DTT 0.1mM.
8. Se empleó el método reportado por Ellmerich en el 2000 (55) para extracción de proteínas totales mediante PBS 0.5M pH 6, y una posterior disrupción celular con perlas de vidrio, AEBSF-DTT 0.1mM.
9. De acuerdo al método reportado por Tjalsma en el 2006 (62), las proteínas totales fueron extraídas con una solución de Tris-HCl 100mM pH 8 (HCl: CTR, Mty, NL), sacarosa 20% (BBL, E.U.), EDTA 1mM, PBS-Tritón 1% (Mallinckrodt, E.U.), glicerol 10% (Sigma-Aldrich, E.U.), AEBSF-DTT 0.1mM.
10. Como variación del método reportado por Tjalsma, se hizo una incubación posterior con lisozima a 37 °C por 30 min para aumentar la lisis celular.

Para obtener fracciones proteicas solubles, las suspensiones bacterianas en cada una de las soluciones de lisis fueron sometidas a disrupción mecánica mediante 5 ciclos de choques térmicos. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 min, seguido por agitación en vortex 15 s e incubación a -70 °C por 30 min (SANYO Ultra Low MDF192, Ultra Low Temperature Freezer, Japan). Posterior a esto, las muestras fueron sometidas a 7 ciclos de sonicación ultrasónica

(Omni-Ruptor 250 No. 21710, E.U.), a amplitud máxima por 30 s, con intervalos de 90 s de incubación en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm por 30 min para obtener las fracciones solubles, las cuales fueron concentradas por liofilización (LABCONCO Corporation No. 64132, E.U.) redisueltas en 2 mL de agua destilada estéril y fueron cuantificadas por Bradford. Se evaluó mediante SDS-PAGE (Apéndice C) la calidad de los antígenos procedentes de los preparados antigénicos totales y fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización.

#### **4.2.3. Estandarización del SDS-PAGE**

Se estandarizó el porcentaje de bis-acrilamida de un SDS-PAGE en variante lineal y en gradiente así como la concentración del extracto antigénico de *S. bovis* para visualizar la calidad proteica de los extractos antigénicos: Lineal (7.5, 10, 15%) y en gradiente (3-20%) para separación de proteínas con amplio rango de peso molecular. Se probaron distintas diluciones de los extractos (1:2, 1:5, 1:10) en cada variante. Las bandas fueron visualizadas en los geles mediante tinción con azul de Coomasie (BioRad Laboratories, CA, E.U.) y tinción con plata (Apéndice C).

Los perfiles proteicos de los preparados antigénicos totales fueron comparados para seleccionar el de mejor rendimiento proteico y mayor bandeo de proteínas, para la producción de un suero hiperinmune anti-*S. bovis*.

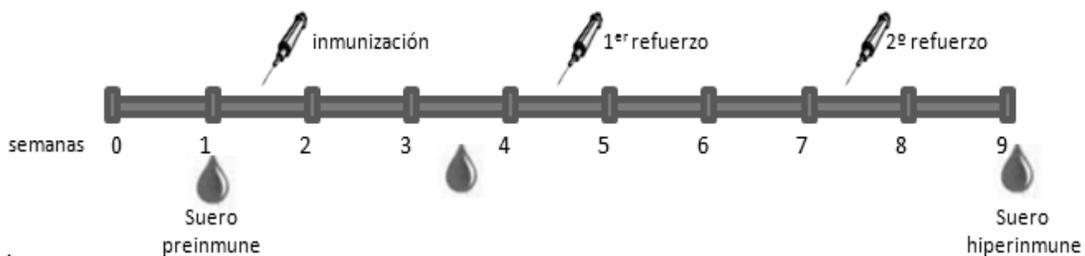
#### **4.2.4. Producción de suero hiperinmune anti-*S. bovis***

Seleccionado el extracto antigénico, se inmunizó un conejo para obtener suero hiperinmune anti-*S. bovis*. Se utilizaron dos conejos raza Nueva Zelanda, machos, de 3 meses de edad y de 1.5 kg de peso. Previo a la inmunización, se extrajo 1.5 mL de sangre de la vena marginal de la oreja para colectar el suero preinmune.

El esquema de inmunización se muestra en la Figura 8. Se utilizó un conejo como control negativo al cual se le administró solamente solución salina. El segundo conejo fue inmunizado vía subcutánea el día 10, utilizando una aguja 22G. Se le administraron 4 dosis de una

suspensión de células completas en concentración de 1000  $\mu\text{g}/0.25 \text{ mL}$ , utilizando como vehículo adyuvante incompleto de Freund para potenciar la respuesta. Catorce días después de la inmunización, se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja para determinar la presencia de anticuerpos anti-*S. bovis* por el método de doble difusión en placa o técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony. Esta técnica fue realizada en placas de agarosa al 0.8%. Se hicieron 6 pocillos en la periferia de la placa, en los que se colocaron diluciones del suero extraído del conejo (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:16, 1:32) y un pocillo central, en el que se colocó la suspensión de células de *S. bovis*. La placa fue incubada a temperatura ambiente por 24-48 h para su revelado. Durante este tiempo, las moléculas de antígeno y anticuerpo difunden a través del agar. Al alcanzar una proporción óptima, llamada zona de equivalencia, forman un complejo antígeno-anticuerpo, el cual precipita en el gel y es visualizado en forma de líneas de precipitación (Figura 10).

Posterior a la inmunización, se administraron 2 refuerzos inmunogénicos. Se administró un primer refuerzo de dosis subsecuente de extracto antigénico sin adyuvante 21 días después de la inmunización, y otro, 21 días después del primer refuerzo. Diez días después del segundo refuerzo, se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja para obtener el suero hiperinmune. La sangre fue incubada a 37 °C por 30 min y posteriormente se mantuvo a 4 °C por 2 h. Se centrifugó a 5000 rpm por 20 min para separar el coágulo y recuperar el suero hiperinmune. El suero fue separado en alícuotas y almacenado a -20 °C hasta su utilización.



**Figura 8.** Esquema de inmunización para obtener suero hiperinmune anti-*S. bovis*.

#### **4.2.5. Purificación antigénica de *S. bovis***

Los preparados antigénicos totales fueron separados en distintas fracciones proteicas mediante un proceso de purificación manual. Se empleó un método de elución selectiva basado en un principio de intercambio iónico para obtener fracciones purificadas de cada preparado antigénico, usando una resina catiónica. El proceso fue desarrollado en el laboratorio de Microbiología Molecular del CRCEI y actualmente se encuentra en preparación para su protección intelectual (Garza E, Moreno V, Merino E., Sigma Alimentos). Las fracciones antigénicas fueron almacenadas a -20 °C hasta su evaluación en la estandarización del ELISA.

#### **4.2.6. Estandarización del ELISA**

Una vez que se obtuvieron las 10 preparaciones antigénicas, las fracciones purificadas correspondientes y el suero hiperinmune anti-*S. bovis*, se realizaron diversos ensayos para la optimización de un ELISA no competitivo indirecto para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-*S. bovis* en individuos sometidos a colonoscopia. Se evaluaron los componentes reactivos del ELISA: Concentración antigénica de recubrimiento de la placa, concentración de bloqueador, dilución de trabajo de las muestras a evaluar y dilución del conjugado. Para la realización del ELISA, el antígeno de recubrimiento a evaluar fue suspendido en buffer de carbonatos 0.05M pH 9.6. Se colocaron 100 µL en cada celda de una placa de polipropileno, la cual fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Se realizaron 2 lavados con buffer de lavado pH 8.0: Tris 50mM (USBiological), NaCl 0.14M (Research Organics, E.U.), Tween 20 0.05% (Research Organics), en un lavador de placas (ImmunoWash, Model 1575, BioRad Laboratories, Italia) para descartar el contenido de las celdas. Los sitios inespecíficos en las celdas fueron bloqueados con 200 µL de leche descremada (Svelty, Nestlé) en buffer de lavado. La placa fue incubada a 37 °C por 1 h y posteriormente se le realizaron 3 lavados con buffer de lavado pH 8.0. Se colocó en cada celda de la placa 100 µL de la dilución de suero a evaluar. La placa fue incubada a 37 °C por 1 h y se realizaron 2 lavados con buffer de lavado pH 8.0. En cada celda se colocó 100 µL de la dilución a evaluar de conjugado anti-human IgG-HRP en buffer de lavado. La

placa fue incubada a 37 °C por 1 h y se le realizaron 5 lavados con buffer de lavado pH 8.0 para proseguir con el revelado del ensayo colorimétrico.

Como antígeno de recubrimiento del ensayo se emplearon los antígenos de *S. bovis* obtenidos bajo diferentes procesos de extracción y purificación, y se evaluaron 5 diferentes concentraciones: 5, 7.5, 10, 12.5 y 20 µg/mL. Como controles negativos se utilizaron el suero preinmune de conejo, el cual no mostró niveles de anticuerpos IgG anti-*S. bovis* y sueros de individuos con colonoscopia normal. Como controles positivos se utilizaron el suero hiperinmune de conejo y un suero de paciente con endocarditis por *S. bovis*, el cual fue proporcionado por el Dr. Félix Rositas del Servicio de Infectología del Hospital Universitario de la UANL.

Se evaluaron 9 diluciones del suero hiperinmune de conejo: 1:50, 1:100, 1:200, 1:250, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 y 3 diluciones del suero del paciente con endocarditis por *S. bovis*: 1:100, 1:250 y 1:500. Como muestras, se evaluaron sueros de pacientes sujetos a colonoscopia, con diferentes estadios de la enfermedad, debidamente caracterizados en forma clínica como 1) pólipos no adenomatosos, 2) pólipos adenomatosos y 3) CCR. Todos los sueros fueron probados al menos 2 veces y en 2 diferentes días de realización. Se hicieron diluciones del conjugado anti-IgG-peroxidasa de rábano picante (PRP) (goat anti-human IgG-HRP, goat anti-rabbit IgG-HRP, Sta. Cruz Biotechnology, E.U.) en buffer de dilución: 1:1000, 1:5000, 1:10 000, 1:50 000 y 1:100 000, y las placas se incubaron a 37 °C por 1 h. Como revelado del ensayo colorimétrico se adicionó 100 µL del sustrato TMB (Sigma-Aldrich) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kurax, México). Las placas se incubaron durante 20 min en oscuridad total. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N y se obtuvo la lectura de densidad óptica (OD) una  $\lambda$  de 415 nm en un lector de microplacas.

#### **4.2.7. Análisis de resultados del ELISA**

Para comparar los resultados de todos los sueros en una misma base de datos, se utilizó la Razón de Densidad Óptica (RDO) como criterio, que corresponde a la razón entre el promedio

de las OD de las lecturas obtenidas de cada suero y el valor de OD del suero control positivo de cada placa (suero de paciente con endocarditis por *S. bovis*), con el fin de seleccionar en cada caso las mejores respuestas para el control positivo, el control negativo y el blanco del ensayo:

$$\text{RDO: } \frac{\text{DO de la muestra}}{\text{DO del control positivo}}$$

### **4.3. Validación del ELISA**

#### **4.3.1. Población de estudio**

Para validar el ELISA como prueba diagnóstica predictiva de CCR, se incluyeron muestras de pacientes que asistieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” para estudio de enfermedades digestivas, mayores de 18 años y sometidos a colonoscopia, los cuales fueron recolectados de mayo de 2008 a febrero 2010. Se excluyeron pacientes con obstrucción intestinal, perforación o hemorragias digestivas.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética, No. de registro MB08-006 (ANEXO A) y se solicitó consentimiento informado a los familiares para la obtención de una muestra de sangre coagulada y una biopsia; además, se integró un expediente con el resultado del estudio colonoscópico y del diagnóstico histológico de la biopsia. Las muestras fueron recolectadas de mayo de 2008 hasta febrero de 2010 en colaboración con el Servicio de Gastroenterología y el Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario. Los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización, y las biopsias fueron enviadas al Departamento de Patología para su análisis histológico, y en base a esto, clasificarlas como estadio de CCR (pólipo no adenomatoso, pólipo adenomatoso y carcinoma) o como colon normal (sin alteraciones histológicas).

### **4.3.2. Validación del ELISA**

Con el propósito de determinar la utilidad de la prueba, los sueros de pacientes sujetos a colonoscopia fueron evaluados en el ELISA estandarizado, por triplicado y en 3 diferentes días de realización del ensayo, de acuerdo a la concentración del extracto antigénico seleccionado, dilución de suero a evaluar y dilución de conjugado anti-IgG humana-PRP. La comparación de los resultados de todos los sueros en una misma base se hizo mediante el criterio de RDO, al igual que en la estandarización del ELISA. Las RDO fueron correlacionadas con el estadio de la enfermedad de acuerdo al diagnóstico colonoscópico e histológico de la biopsia: Pólipos no adenomatosos, pólipos adenomatosos o CCR. La ausencia de alteraciones histológicas fue clasificada como colon normal.

### **4.3.3. Curvas ROC**

Para determinar la utilidad diagnóstica del ELISA, se elaboraron curvas ROC para cada estadio de la enfermedad, mediante el programa SPSS 17.0 (SPSS INC, E.U.). Se compararon las pruebas diagnósticas de cada curva y se determinó su capacidad de discriminar a los pacientes asignados como positivos de los negativos; además, se calculó la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica y el ABC como indicador global de la precisión del ELISA como prueba diagnóstica.

## **4.4. Aplicación de la prueba de ELISA**

### **4.4.1. Población de estudio**

La prueba de ELISA fue aplicada en muestras de una población con incidencia alta de CCR. Para este estudio se contó con la colaboración del Dr. Guillermo Ignacio Pérez Pérez del VA Medical Center, Departamento de Medicina y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Nueva York. Se seleccionaron muestras de un banco de sueros, recolectadas de 2004 a 2007, de pacientes que asistieron al Servicio de Gastroenterología para una colonoscopia de control y

que cumplieron con los criterios de inclusión empleados para seleccionar la población control a incluir para la validación del ELISA. Las muestras fueron clasificadas para su análisis de acuerdo al diagnóstico colonoscópico e histológico de la biopsia y fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

#### **4.4.2. Aplicación de la prueba de ELISA**

Con el propósito de aplicar la prueba validada, se evaluaron los sueros de pacientes sujetos a colonoscopia de la población con incidencia alta de CCR, por triplicado y en 3 diferentes días de realización del ensayo. La comparación de los resultados de todos los sueros en una misma base se hizo mediante el criterio de RDO, al igual que en la validación del ELISA. En base al punto de corte fijado, los resultados fueron catalogados como seropositivos o seronegativos y las RDO fueron correlacionadas con el estadio del CCR de acuerdo al diagnóstico colonoscópico e histológico de la biopsia. Para determinar la utilidad de la prueba de ELISA se determinó la razón de momios (Odds ratio: OR), la probabilidad (valor  $p$ ), y como medida de concordancia el índice *Kappa*, utilizando el programa estadístico SPSS 17.0.

#### **4.5. Determinación del patrón de reactividad serológica frente a *S. bovis***

En los seropositivos, se evaluó la variabilidad de bandas entre los patrones de reactividad serológica frente a los antígenos de *S. bovis* mediante Western-blot, para determinar si existía un perfil proteico característico, en búsqueda de posibles marcadores serológicos de la enfermedad.

##### **4.5.1. Estandarización del Western-blot**

Para determinar el patrón de reactividad serológica frente a los antígenos de *S. bovis* en pacientes seropositivos por ELISA, se estandarizó la concentración del extracto antigénico

empleado en el ELISA y las condiciones de transferencia de un SDS-PAGE, así como los componentes de un Western-blot: Condiciones óptimas de bloqueo (2%, 3%), dilución de la muestra a evaluar (1:100, 1:250, 1:500) y dilución de conjugado anti-IgG-PRP (1:1000, 1:5000). Ya estandarizadas las condiciones del SDS-PAGE, se prosiguió a realizar el Western-blot para cada componente (condición óptima de bloqueo, dilución de la muestra a evaluar y dilución de conjugado). El gel obtenido fue transferido a una membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF) de 8 cm de largo x 6 cm de ancho, previamente sumergida por 10 min en un recipiente con buffer de transferencia frío (Apéndice B) para condicionarla. Dentro del recipiente con el buffer de transferencia frío, la membrana fue colocada sobre un soporte de 2 piezas de papel filtro de las mismas dimensiones, que a su vez, estaban sobre una esponja. A manera de sándwich, el gel fue colocado sobre la membrana y fue cubierto por 2 piezas de papel filtro y una esponja, teniendo cuidado de no dejar burbujas entre el gel y la membrana y de no dejar secar la membrana. Para realizar la transferencia, el sándwich fue colocado en la cámara, la cual fue saturada con buffer de transferencia frío. La transferencia se llevó a cabo a 30 V, durante 12 h en hielo. Transcurrido el tiempo, la membrana fue separada del gel con unas pinzas estériles y se verificó la transferencia de las proteínas mediante la adición del reactivo de Ponceau 0.1% (Apéndice B), con el cual, las proteínas se tiñen de color rojo de manera reversible. Al determinar la presencia de las proteínas, la membrana fue lavada con buffer de lavados (Apéndice B) 5 veces durante 10 min cada una y en agitación para eliminar el reactivo de Ponceau. La membrana fue bloqueada con buffer de bloqueo en leche (Apéndice B) durante 1 h a 4 °C y en agitación. Posteriormente, la membrana fue lavada con buffer de lavados, 5 veces durante 10 min cada una y en agitación. La membrana fue cortada en tiras y se colocaron las diluciones correspondientes de los sueros a evaluar. Las tiras fueron incubadas durante 12 h a 4 °C y en agitación. Posterior a este tiempo, las tiras fueron lavadas con buffer de lavados, 5 veces durante 10 min cada una y en agitación. Las tiras fueron incubadas con la dilución a evaluar de conjugado anti-IgG-PRP durante 2 h a 4 °C y en agitación. Posterior a este tiempo, las tiras fueron lavadas con buffer de lavados, 5 veces durante 10 min cada una y en agitación para el revelado de los patrones de bandeos. Se utilizó como sistema revelador diaminobencidina- $H_2O_2$  y como control positivo, el suero de un paciente con endocarditis por *S. bovis*.

#### **4.5.2. Western-blot**

En búsqueda de posibles marcadores serológicos de la enfermedad y con la finalidad de determinar asociación de la infección y seropositividad con los estadios del CCR, a los seropositivos por ELISA se les determinó, mediante Western-blot, el patrón de reactividad serológica frente a la fracción antigénica empleada en el ELISA, y los perfiles fueron comparados de acuerdo a la clasificación del diagnóstico colonoscópico e histológico de la biopsia. En base a los resultados, se hizo un análisis posterior de los perfiles serológicos de pacientes con lesiones preneoplásicas en colon, independientemente del resultado del ELISA (positivo o negativo).

#### **4.5.3. Análisis del Western-blot y evaluación como prueba diagnóstica**

Una vez obtenidos los perfiles serológicos de cada muestra, se hizo un análisis univariado y múltiples comparaciones entre las combinaciones de bandeos de proteínas para determinar si existía un patrón característico entre ellos. Para el análisis de los resultados se incluyó la corrección de continuidad de Yates. El Western-blot fue evaluado como prueba diagnóstica y se calcularon los parámetros de OR, valor  $p$ , sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Para evaluar la consistencia en la interpretación de las bandas, se determinó la concordancia entre 2 observadores, mediante el índice *Kappa* ponderado propuesto por Cohen. La Tabla 1 muestra la interpretación del Índice *Kappa* según el rango de valores para determinar el grado de concordancia entre los observadores.

Kappa	Grado de concordancia
<0	Sin acuerdo
0 – 0.2	Insignificante
0.2 – 0.4	Bajo
0.4 – 0.6	Moderado
0.6 – 0.8	Bueno
0.8 – 1	Muy bueno

**Tabla 1.** Interpretación del Índice *Kappa* para determinar el grado de concordancia entre observadores.

## Capítulo 5

### 5. Resultados

#### 5.1. Estandarización del ELISA

##### 5.1.1. Identificación bacteriana

Debido a que *S. bovis* biotipo I se ha asociado con mayor frecuencia al desarrollo de CCR, se confirmó la identificación de la cepa de *S. bovis* a utilizar, mediante el sistema de identificación Rapid ID32 Strep System. El resultado de las pruebas bioquímicas se muestra en la Tabla 2. De acuerdo a los resultados, la cepa fue identificada como *S. gallolyticus* sub *gallolyticus*, anteriormente clasificada como *S. bovis* biotipo I.

Producción		Resultado
ADH	alcohol deshidrogenasa	-
$\beta$ -GLU	$\beta$ - glucoronidasa	+
$\alpha$ -GAL	$\alpha$ - galactosidasa	-
$\beta$ -GAL	$\beta$ - galactosidasa	-
APPA	alanina-fenilalanina-prolina arilamidasa	+
GTA	glicil triptófano arilamidasa	-
PAL	leucina arilamidasa	-
PyrA	pirrolidonil-arilamidasa	-
$\beta$ -NAG	N- acetil- $\beta$ - glucoaminidasa	-
$\beta$ -MAN	$\beta$ - manosidasa	-
Hidrólisis		
HIP	hipurato	-
URE	urea	-
Producción de ácido		
CDEX	ciclodextrina	-
DARL	D- arabitol	-
LARA	L- arabinosa	-
MLZ	melezitosa	-
TAG	tagarosa	-
RIB	ribosa	-
MAN	manosa	+
SOR	sorbitol	-
LAC	lactosa	+
TRE	trehalosa	+
RAF	rafinosa	+
SAC	sacarosa	+
MAL	maltosa	+
PUL	pullulan	+
MEL	melibiosa	-
GLYG	glucógeno	+
M $\beta$ DG	metil- $\beta$ -D- glucopiranosida	+

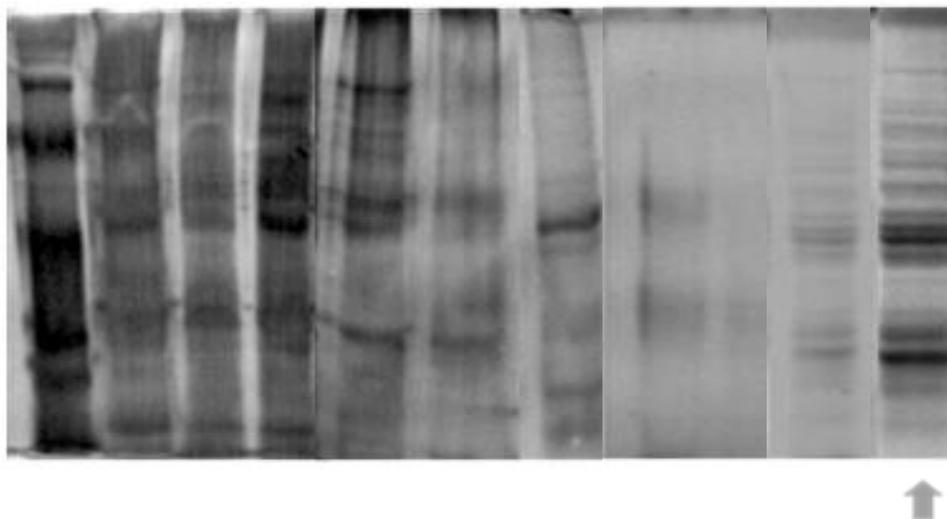
**Tabla 2.** Caracterización bioquímica de la cepa de *S. bovis* ATCC 9808 utilizada mediante el sistema de identificación Rapid ID32 Strep System (BioMérieux).

### **5.1.2. Extracción antigénica de *S. bovis***

Los sedimentos bacterianos fueron resuspendidos en 10 diferentes soluciones de lisis para obtener preparados antigénicos de distinta calidad proteica, la cual fue visualizada en geles SDS-PAGE lineales al 10% teñidos con azul de Coomasie y plata.

Los perfiles proteicos de los preparados antigénicos totales fueron comparados, tal como se muestra en la Figura 9, para seleccionar el de mejor rendimiento proteico y mayor bandeo de proteínas para la obtención del suero hiperinmune anti-*S. bovis*.

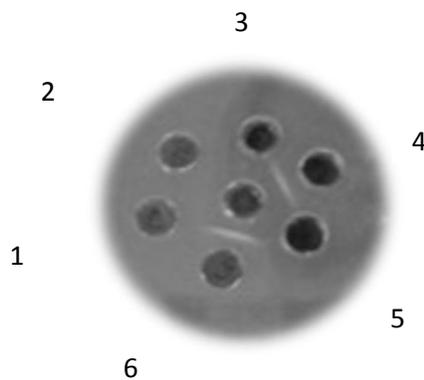
Carriles 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



**Figura 9.** Perfiles proteicos de los preparados antigénicos totales. Carril 1: Marcador de peso molecular (BioRad, 161-0318). Carril 2: Obtenido con la solución de lisis de Boissinot (1987). Carril 3: Obtenido con la solución de lisis de Boissinot e incubación posterior con lisozima. Carril 4: Obtenido con la solución de lisis de González Sosa (2002). Carril 5: Obtenido con la solución de lisis de González Sosa e incubación posterior con lisozima. Carril 6: Obtenido con la solución de lisis de Bogart (2005). Carril 7: Obtenido de la extracción con acetona. Carril 8: Obtenido con la solución de lisis de Scholler (1981). Carril 9: Obtenido con la solución de lisis de Ellmerich (2000). Carril 10: Obtenido con la solución de lisis de Tjalsma (2006). Carril 11: Obtenido con la solución de lisis de Tjalsma e incubación posterior con lisozima. La flecha indica el perfil del extracto antigénico empleado para obtención de suero hiperinmune anti-*S. bovis*.

### 5.1.3. Producción de suero hiperinmune anti-*S. bovis*

Para la obtención del suero hiperinmune, se seleccionó el extracto antigénico obtenido con el método reportado por Tjalsma en el 2006 (62), e incubación posterior de la muestra con lisozima a 37 °C. La presencia de anticuerpos séricos anti-*S. bovis* fue confirmada por el método de doble difusión en placa, tal como lo muestra la Figura 10.



**Figura 10.** Determinación de la presencia de anticuerpos anti-*S. bovis* por el método de doble difusión en placa. Pocillos en la periferia de la placa: diluciones de suero de conejo. Pocillo 1: dilución 1:2. Pocillo 2: dilución 1:4. Pocillo 3: dilución 1:6, Pocillo 4: dilución 1:8. Pocillo 5: dilución 1:16. Pocillo 6: dilución 1:32. Pocillo central de la placa: Preparado antigénico de *S. bovis*. Se observa la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo.

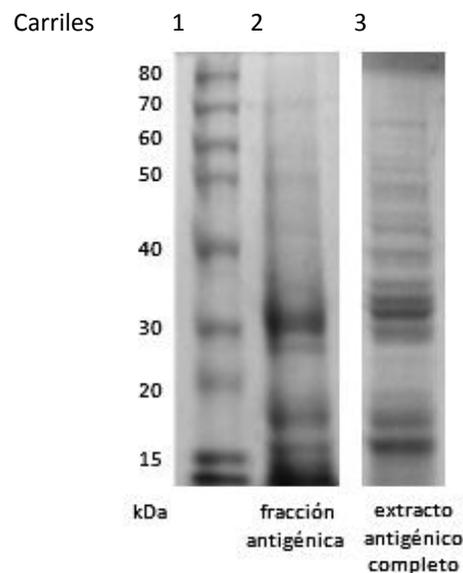
#### **5.1.4. Purificación antigénica de *S. bovis***

Con el método de elución selectiva basado en intercambio iónico se obtuvieron 10 fracciones purificadas a partir de cada preparado antigénico obtenido por los métodos de extracción probados. Las fracciones fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso en la estandarización del ELISA.

#### **5.1.5. Estandarización del ELISA**

El ELISA no competitivo indirecto fue estandarizado con las condiciones en que se obtuvieron las mejores respuestas para el control positivo, el control negativo y el blanco del ensayo, de acuerdo a las RDO obtenidas del análisis de los resultados.

Las condiciones óptimas fueron las siguientes: Como antígeno de recubrimiento de la placa, se empleó una fracción antigénica en concentración de 5 µg/mL, purificada a partir del preparado antigénico total obtenido con el método reportado por Tjalsma en el 2006 (62), el cual fue empleado para la obtención del suero hiperinmune. Con esta fracción, la señal del suero control positivo se mantuvo a concentraciones superiores y se obtuvo la menor señal para el control negativo y el blanco reactivo. La calidad proteica de la fracción antigénica fue visualizada en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie, tal como lo muestra la Figura 11. Se observó un perfil de proteínas con un rango de peso molecular entre 15 y 50 kDa, a diferencia del perfil de proteínas observado del extracto antigénico total del cual se purificó (Figura 9). La dilución para las muestras de sueros a evaluar fue 1:250, con incubación a 37 °C por 1 h; y conjugado anti-IgG humana-PRP en dilución 1:10000 incubado a 37 °C por 1 h. Esta dilución mostró las mejores diferencias en las señales de absorbancia entre el suero control positivo y el control negativo. Estas condiciones fueron empleadas para la validación del ELISA, con muestras de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.



**Figura 11.** Perfil de proteínas de la fracción antigénica seleccionada para validación del ELISA y perfil del extracto antigénico total del cual se extrajo.

## **5.2. Validación del ELISA**

### **5.2.1. Población de estudio**

Para la validación del ELISA se incluyeron sueros de 155 pacientes. De acuerdo a la apreciación del colon por colonoscopia y al diagnóstico histológico de la biopsia, el 69% (n=107) de los pacientes no presentó alteraciones histológicas en el colon, por lo que fueron clasificados con colon normal, el 11% (n=17) presentó pólipos no adenomatosos, 6% (n=9) pólipos adenomatosos y 14% (n=22) CCR.

### **5.2.2. Validación del ELISA**

Los 155 sueros fueron evaluados en el ELISA estandarizado. Para comparar los resultados, se obtuvo la RDO y se correlacionó con el diagnóstico colonoscópico e histológico de la biopsia.

### **5.2.3. Curvas ROC**

La utilidad diagnóstica del ELISA fue determinada mediante la elaboración de curvas ROC para validar las pruebas diagnósticas de cada estadio de la enfermedad y colon normal.

Para el análisis de las curvas ROC, se empleó como criterio diagnóstico una escala con valores del 1 al 6, de acuerdo a rangos de RDO (obtenidas de la evaluación de los sueros en el ELISA) asignados de manera arbitraria. La Tabla 3 muestra la asignación de rangos de RDO y la definición del criterio diagnóstico de acuerdo a la escala utilizada.

Criterio	Escala	Rango de RDO
Definitivamente negativo	1	0-0.10
Probablemente negativo	2	0.11-0.30
Posiblemente negativo	3	0.31-0.49
Punto de corte		0.50
Posiblemente positivo	4	0.51-0.70
Probablemente positivo	5	0.71-0.80
Definitivamente positivo	6	0.81->0.90

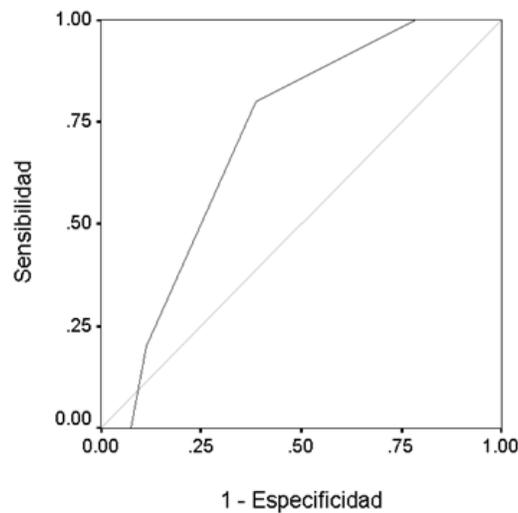
**Tabla 3.** Criterio diagnóstico correspondiente a la escala con valor de 1 al 6 y asignación de rangos de RDO.

Se asignó a cada resultado del ELISA un valor de 0 o 1, dando el valor de 1 al diagnóstico de la prueba a analizar, para la construcción de su correspondiente curva ROC, y su análisis posterior, para ser clasificados como definitivo, probable o posiblemente negativos o positivos de acuerdo al punto de corte de 0.5.

Se compararon las pruebas diagnósticas de pólipos adenomatosos y CCR. Se hicieron estudios de correlación, una vez fijado el punto de corte. Se obtuvieron distintos valores de sensibilidad/especificidad para cada prueba, tal como se muestra en la Tabla 4, y se observó que las muestras de pacientes clasificados con pólipos adenomatosos, permiten dar un criterio sobre la sensibilidad y especificidad del método, de 80% y 61% respectivamente. La exactitud diagnóstica de la prueba fue de 62 y la curva mostró un ABC de 0.714. La Figura 12 muestra la curva ROC de la prueba diagnóstica de pólipos adenomatosos.

Diagnóstico	n	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Pólipos adenomatosos	9	80	61
Cáncer de colon	22	59	62
Pólipos adenomatosos-cáncer de colon	31	52	62

**Tabla 4.** Pruebas diagnósticas y valores de sensibilidad/especificidad obtenidos en base al punto de corte fijado.



**Figura 12.** Curva ROC de la prueba diagnóstica de pólipos adenomatosos.

### 5.3. Aplicación de la prueba de ELISA

#### 5.3.1. Población de estudio

Con el propósito de aplicar la prueba de ELISA validada en una población con incidencia alta de CCR, se seleccionaron específicamente sueros de pacientes con pólipos adenomatosos, y como controles, sueros de pacientes con colonoscopia normal.

De acuerdo al estudio colonoscópico y al diagnóstico histológico de la biopsia, de los 383 sueros incluidos para el estudio, el 32% (n=135) correspondía a pacientes con pólipos adenomatosos y el 68% (n=248) a pacientes con colonoscopia normal.

### **5.3.2. Aplicación de la prueba de ELISA**

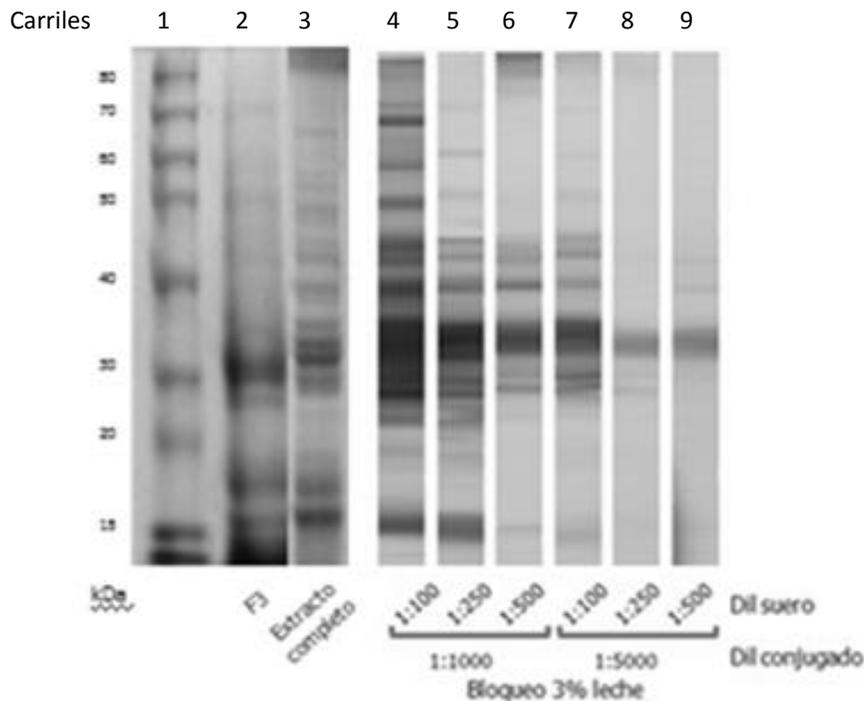
La prueba de ELISA fue aplicada en los 383 sueros de pacientes sometidos a colonoscopia de control. De acuerdo al análisis de correlación entre el RDO y el diagnóstico, los pacientes fueron clasificados de acuerdo al punto de corte fijado, como seropositivos (RDO > 0.5) o seronegativos (RDO < 0.5).

El valor de OR (IC del 95%) obtenido fue de 0.99 (0.62-1.57), el valor *p* 1.0, y el índice *Kappa* 0.023. Aunque el ELISA validado presentó una buena sensibilidad y exactitud, se determinó que no tiene aplicación diagnóstica, ya que, de acuerdo al análisis, no hubo concordancia entre los resultados del ELISA y el diagnóstico histopatológico.

## **5.4. Determinación del patrón de reactividad serológica frente a *S. bovis***

### **5.4.1. Estandarización del Western-blot**

Para determinar el patrón de reactividad serológica frente a la fracción antigénica de *S. bovis* en pacientes seropositivos por ELISA, se estandarizó un Western-blot, tal como se muestra en la Figura 13. Se realizó un SDS-PAGE al 10% (Apéndice C), se emplearon 50 µg del extracto antigénico purificado empleado en la estandarización del ELISA, y se realizó la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF a 30 V durante 12 h en hielo. El Western-blot fue estandarizado con las siguientes condiciones: Concentración de 3% de bloqueo con leche semidescremada (Svelty, Nestlé) en buffer de lavado, dilución 1:100 de la muestra a evaluar y dilución 1:1000 de conjugado. Se utilizó como sistema revelador DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y como control positivo, el suero de paciente con endocarditis por *S. bovis*.

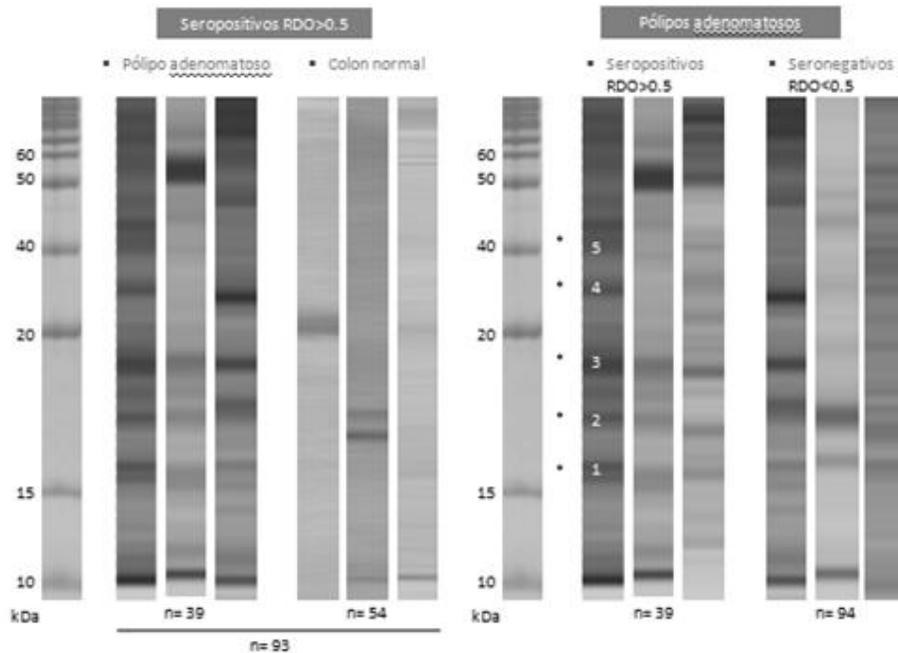


**Figura 13.** Estandarización del Western-blot para determinar el patrón de reactividad serológica en seropositivos frente a la fracción antigénica de *S. bovis*.

#### 5.4.2. Western-blot

De los seropositivos evaluados en el ELISA (n=93), el 42% (n=39) fueron de pacientes con pólipos adenomatosos y el 58% (n=54) de pacientes con colon normal. Se determinó el patrón de reactividad serológica frente a la fracción antigénica purificada de *S. bovis* empleada en el ELISA y se evaluó la variabilidad de bandas entre los patrones obtenidos. No se encontró un patrón de bandeo característico comparando ambos grupos; sin embargo, en los perfiles de pacientes con pólipos adenomatosos se observó un bandeo característico. En base a ese dato, se hizo un análisis posterior de Western-blot, incluyendo a los pacientes seronegativos con pólipos adenomatosos. Se compararon los perfiles de Western-blot de pacientes con y sin pólipos adenomatosos independientemente del resultado del ELISA y se identificó un patrón de

5 proteínas con peso molecular entre 15 y 50 kDa en la mayoría de los sueros de pacientes con pólipos adenomatosos. Las bandas fueron clasificadas con valor numérico del 1 al 5. En la Figura 14 se muestran algunos ejemplos de los perfiles serológicos obtenidos frente a los antígenos de *S. bovis* y la presencia del patrón característico observado en los perfiles de pacientes con pólipos adenomatosos.



**Figura 14.** Perfiles serológicos de seropositivos y pólipos adenomatosos frente a la fracción antigénica de *S. bovis*. Los números 1 al 5 corresponden a las 5 bandas con peso molecular entre 15 y 50 kDa, observadas en los perfiles de pacientes con pólipos adenomatosos, independientemente del resultado del ELISA.

#### 5.4.3. Análisis del Western-blot y evaluación como prueba diagnóstica

En base al patrón de 5 bandas observado en los perfiles serológicos, se hizo un análisis de la presencia de cada banda en particular en todas las muestras evaluadas (n=187). Tal como se

muestra en la Tabla 5, se obtuvieron valores de OR de 4.5 a 9, valor de  $p < 0.05$  y valores de sensibilidad del 85% al 89%.

Banda	n	OR (IC 95%)	Valor p	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
1	128	8.4 (4.20-17.06)	<0.0001	85	59	81.9	64.8
2	101	5.4 (2.67-10.95)		86	46	65.4	74.1
3	91	4.5 (2.19-9.13)		86	43	58.6	75.9
4	118	7.8 (3.84-15.88)		86	55	76.7	70.4
5	105	9.4 (4.4-20.15)		89	52	70.7	79.6

**Tabla 5.** Análisis de la presencia de una banda antigénica característica en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.

Al analizar las posibles combinaciones de 2 de las 5 bandas características, se obtuvieron valores de OR de 3 a 22, valor de  $p < 0.05$  y rango de sensibilidad del 87 al 96%. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Banda	n	OR (IC 95%)	Valor p	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
1, 2	74	10.6 (3.96-28.19)	<0.0001	93	43	51.9	90.7
1, 3	75	10.9 (4.08-29.05)		93	44	52.6	90.7
1, 4	89	22.1 (7.53-65.08)		95	51	63.9	92.6
1, 5	86	12.1 (4.83-30.21)		93	47	60.1	88.9
2, 3	61	3.8 (1.67-8.71)	0.001	87	36	39.8	85.2
2, 4	71	12.7 (4.34-37.14)	<0.0001	94	43	50.4	92.6
2, 5	66	8.3 (3.11-22.16)		92	40	45.9	90.7
4, 3	59	8.8 (3.0-25.84)		93	39	41.3	92.6
4, 5	77	21.3 (6.33-71.78)		96	46	55.6	94.4

**Tabla 6.** Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 2 bandas antigénicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.

Adicionalmente, se analizaron las posibles combinaciones de 3 de las 5 bandas características presentes en el perfil, y se obtuvieron valores de OR de 7 a 98, valor de  $p < 0.05$  y sensibilidad del 90 al 100%. Como ejemplo, la presencia de las combinación de las bandas 1, 4 y 5, representa un riesgo de 98 veces de presentar pólipos adenomatosos. Estos resultados se muestran en la Tabla 7.

Banda	n	OR (IC 95%)	Valor p	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
1, 2, 3	52	7.1 (2.4-20.75)	<0.0001	92	37	36.1	92.6
2, 3, 4	40	10.4 (2.41-44.87)		95	35	28.6	96.3
3, 4, 5	43	11.6 (2.69-49.9)		95	36	30.8	96.3
1, 4, 5	63	98.2 (5.9-1623.8)		100	43	47.4	100
1, 2, 5	55	10.9 (3.24-36.8)		94	39	39.1	94.4

**Tabla 7.** Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 3 bandas antigénicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.

El análisis de las posibles combinaciones de 4 de las 5 bandas características, así como la presencia de las 5 bandas en los perfiles serológicos, mostró valores de OR de 10 a 47, valor de  $p < 0.05$  y sensibilidad del 100%, tal como se muestra en la Tabla 8.

PM (kDa)	OR (IC 95%)	Valor p	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
45, 50, 55, 75	40.8 (2.4-678)	<0.0001	100	36	27.1	100
50, 55, 75, 100	30.8 (1.8-513)		100	34	21.8	100
45, 55, 75, 100	45.6 (2.7-756)		100	36	29.3	100
45, 50, 75, 100	47.2 (2.8-783)		100	37	30.1	100
45, 50, 55, 100	10.4 (2.4-44.8)		95	35	28.6	96.3
45, 50, 55, 75, 100	29.4 (1.7-492)		100	34	21	100

**Tabla 8.** Análisis y múltiples comparaciones de la presencia de 4 y 5 bandas antigénicas características en perfiles serológicos obtenidos por Western-blot.

Para analizar los resultados obtenidos de las tablas mostradas con las posibles combinaciones entre las bandas características, se evaluó el grado de concordancia entre los observadores al interpretar los patrones de bandeo. El índice *Kappa* ponderado fue de 0.9, con un IC del 95% de 0.86-1.0, que de acuerdo a la Tabla 1, el grado de concordancia entre los observadores fue muy bueno al analizar los perfiles serológicos obtenidos mediante Western-blot.

## Capítulo 6

### 6. Discusiones

La detección temprana del CCR es crítica para el tratamiento efectivo de la enfermedad, ya que representa un problema médico de gran magnitud a nivel mundial por la alta mortalidad asociada (10). Es de particular importancia contar con pruebas sensibles y específicas para la detección oportuna de esta enfermedad, idealmente, para detección de condiciones preneoplásicas.

La colonoscopia es el estudio de elección para la detección de neoplasias en colon; sin embargo, es un procedimiento invasivo que representa importantes riesgos y molestias para el paciente. Para el control de CCR, es importante la detección temprana de CCR o la identificación de individuos en riesgo (58).

La flora intestinal es un factor importante para mantener la homeostasia intestinal; sin embargo, algunas especies han sido asociadas con un incrementado riesgo de desarrollar CCR (63). *Streptococcus bovis*, como parte de la flora intestinal, ha sido implicado en endocarditis humana y se ha relacionado con CCR (51, 53). En base al estudio de Tjalsma en el 2006, se han propuesto 2 posibles modelos de asociación de *S. bovis* con cáncer de colon (47). Primero, los pólipos o neoplasias en colon proveen un excelente nicho para la bacteria, seguido por proliferación bacteriana e infección. Segundo, una infección bacteriana de células epiteliales puede inducir la formación de un pólipo y subsecuentemente la formación de un tumor (47); sin embargo, aun no se ha determinado si *S. bovis* tiene una relación causal con el cáncer, o si la neoplasia, como condición preexistente, permite el sobre crecimiento de la bacteria en el intestino grueso. Los estudios que se han hecho hasta el momento no confirman una asociación de la bacteria con CCR, ya que se han realizado con cepas y especies diferentes debido a las reclasificaciones de *S. bovis* en biotipos (59), se han utilizado preparaciones antigénicas crudas, se ha incluido un número reducido de pacientes y los sujetos control han sido incluidos sin tomar en cuenta las características del colon mediante un estudio colonoscópico. La asociación

de *S. bovis* con CCR podría conducir al desarrollo de una herramienta diagnóstica para la identificación de individuos con estadios tempranos de CCR. Después del estudio realizado por Darjee y Gibb en el 1993 (58), no hay estudios serológicos que exploren la asociación de *S. bovis* con CCR.

En el presente estudio, una prueba de ELISA fue evaluada como prueba diagnóstica de lesiones preneoplásicas en colon. Como primera estrategia de la evaluación de la respuesta inmune humoral, se evaluó si la respuesta inmune humoral contra *S. bovis* está asociada con la presencia de lesiones preneoplásicas en colon. La prueba de ELISA fue validada en sueros de pacientes sometidos a colonoscopia, y mediante el análisis de curvas ROC, la prueba diagnóstica de pólipos adenomatosos presentó una sensibilidad y especificidad del 80% y 61% respectivamente, lo cual sugirió una correlación entre el incremento del título de anticuerpos IgG anti-*S. bovis* y la presencia de pólipos adenomatosos. Los resultados parecían promisorios al aplicar la prueba, ya que tuvo una buena exactitud diagnóstica y el área bajo la curva fue superior al 70%. Sin embargo, de acuerdo al análisis realizado en una población con alta incidencia de CCR y el análisis de un mayor número de sueros seleccionados (n=135) de pacientes con pólipos adenomatosos, no hubo correlación entre los resultados del ELISA y el diagnóstico de la colonoscopia y biopsia, por lo que se determinó que el ELISA no puede ser aplicado en la población como prueba diagnóstica de lesiones preneoplásicas.

Un factor que puede haber contribuido a estos resultados, es que en la estandarización del ELISA se analizó un número reducido de pacientes con pólipos adenomatosos (6%, n=9), lo cual redujo el poder estadístico de manera importante. Otra potencial explicación de los resultados es que aunque en el ELISA se obtuvieron las mejores señales para el suero control positivo, control negativo y blanco reactivo con el preparado antigénico utilizado, éste contenía mezclas de antígenos que podrían ser específicos y no específicos de especie, tal como lo reportaron Darjee y Gibb (58). En base a que se utilizó un proceso para extraer proteínas totales de células completas de *S. bovis*, no selectivo, así como un método de purificación antigénica parcial, el ELISA no pudo diferenciar a los pacientes con lesiones preneoplásicas de los controles. Esto podría ser resuelto mediante la purificación de antígenos.

Para distinguir una respuesta de anticuerpos específica contra *S. bovis* de un incremento no específico en el título de anticuerpos contra microorganismos filogenéticamente relacionados y de importancia médica que pudieran haber estimulado el sistema inmune humoral del paciente, ya sea por inmunización previa (por ejemplo, con vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*) o por haber padecido el proceso infeccioso en cuestión, es necesario determinar la especificidad de la prueba, empleando lisados de bacterias cercanas filogenéticamente a *S. bovis*, incluso de especies que formen parte de la microflora intestinal, como *Escherichia coli*, que ha sido asociadas al desarrollo de CCR (45).

En búsqueda de posibles marcadores serológicos de la enfermedad y con la finalidad de determinar la asociación probable de la bacteria con lesiones preneoplásicas en colon, se compararon mediante Western-blot, los patrones de bandeo de los seropositivos, comparando los de lesiones preneoplásicas con los de colon normal, y en este análisis no se observó un patrón característico que indicara correlación con la seropositividad. Este resultado explica la falta de correlación observada en el ELISA y confirma que es necesario llevar a cabo una purificación antigénica de *S. bovis*.

En base a este resultado, se evaluaron los perfiles antigénicos en los pacientes seronegativos con pólipos adenomatosos. Al comparar los patrones de bandeo de las muestras de pacientes con pólipos adenomatosos contra los pacientes observados en pacientes sin pólipos adenomatosos (colon normal), independientemente del resultado del ELISA, se observó la presencia de 5 proteínas en diferentes muestras y proporciones, no identificadas y con peso molecular entre 15 y 50 kDa. Nuestros hallazgos se correlacionan con estudios previos reportados por Tjalsma (63), en los que se realizó un análisis en SDS-PAGE de un lisado de células totales de *S. bovis* biotipo I, y se observaron proteínas con peso molecular entre 10 y 60 kDa, que mediante un análisis molecular, se sugirió que podrían ser proteínas de superficie bacteriana, y esto podría dar soporte a los modelos de asociación propuestos de *S. bovis* con cáncer de colon. A diferencia del reporte de Tjalsma (63), el cual se limitó a la obtención y purificación de antígenos y la determinación del perfil de proteínas en un análisis de SDS-PAGE. Nuestros resultados confirman no solo la presencia de estas 5 proteínas, sino también que son

inmunogénicas, ya que son detectadas en la mayoría de los pacientes con pólipos adenomatosos a diferencia de los pacientes con colon normal.

En adición, se han detectado perfiles antigénicos de *S. bovis* en pacientes con pólipos preneoplásicos (62), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo confirman esta asociación, y sugieren que la infección con esta bacteria podría presentarse en fase temprana durante la carcinogénesis en colon.

Al evaluar los perfiles serológicos obtenidos del Western-blot en base a la presencia de las 5 proteínas características, como únicas o en múltiples combinaciones y su asociación con la presencia de pólipos adenomatosos, todos los valores de OR fueron significativos y la sensibilidad fue de 85% a 100%, como en el caso de la presencia de 3 proteínas séricas de peso molecular ~15, 35 y 45 kDa, que está asociada a un riesgo elevado de presentar pólipos adenomatosos (98 veces), ya que este patrón no se observó en los controles con colon normal. Si la presencia de estas proteínas en el perfil serológico de los pacientes con pólipos adenomatosos refleja la presencia de *S. bovis* en colon, entonces eso implicaría que *S. bovis* estimula el sistema inmune antes o durante la formación de pólipos adenomatosos y la presencia de esas bandas podría ser un marcador útil para el diagnóstico de pólipos adenomatosos; por lo tanto, el Western-blot podría ser validado como prueba para predecir la presencia de pólipos adenomatosos en colon sin necesidad de realizar una colonoscopia.

Existe la necesidad de desarrollar una buena prueba de tamizaje de CCR, particularmente, una prueba que permita detectar lesiones tempranas. La detección de sangre oculta en heces, la cual es sensible y no específica, y el antígeno carcinoembrionario (ACE) es regularmente detectado solo en estadios avanzados de la enfermedad (58). Los resultados presentados en este estudio sugieren que es posible desarrollar una prueba de tamizaje para detección de lesiones preneoplásicas en colon. Investigaciones adicionales son necesarias para identificar los antígenos de *S. bovis* que podrían discriminar entre los grupos con diferentes estadios de CCR, mediante la medición de anticuerpos séricos contra antígenos específicos de *S. bovis*, lo cual apunta como un buen indicador de cáncer de colon en etapas tempranas.

## Capítulo 7

### 7. Conclusiones

- De acuerdo al análisis, la prueba de ELISA desarrollada es de poca utilidad para el diagnóstico de pólipos adenomatosos, ya que no hubo correlación entre los resultados del ELISA y el diagnóstico de la colonoscopia y biopsia.
- La prueba de ELISA no pudo diferenciar a los pacientes con lesiones preneoplásicas de los controles, en base a que se utilizó un proceso para extraer proteínas totales de células completas de *S. bovis*, no selectivo, así como un método de purificación antigénica parcial.
- El Western-blot mostró valores de sensibilidad superiores al 85%, por lo que podría ser una herramienta no invasiva útil para la predicción de lesiones preneoplásicas en colon.
- Se determinó que las 5 bandas antigénicas detectadas en el Western-blot con peso molecular entre 15 y 50 kD son inmunogénicas, al observarse en la mayoría de los pacientes con pólipos adenomatosos en contraste con los perfiles proteicos observados en los pacientes con colon normal.
- De acuerdo a los resultados observados en el Western-blot, la seropositividad a *S. bovis* está asociada con la presencia de lesiones preneoplásicas en colon.

## Capítulo 8

### 8. Perspectivas

- Identificar las 5 proteínas de la fracción antigénica utilizada y purificarlas para optimización y validación del ELISA como prueba diagnóstica de lesiones preneoplásicas.
- Analizar el patrón de reactividad serológica en sueros de pacientes con cáncer de colon y compararlos con el patrón de pólipos adenomatosos, para evaluar la presencia de las 5 proteínas características y determinar si la infección por *S. bovis* se asocia con estadios tempranos del cáncer de colon.
- Realizar ensayos para determinar la especificidad del Western-blot, empleando lisados de bacterias cercanas filogenéticamente a *S. bovis* y de bacterias que formen parte de la microflora intestinal.
- Determinar por métodos microbiológicos y moleculares la presencia de *S. bovis* en heces y en biopsias de colon, y correlacionar los resultados con el diagnóstico colonoscópico, histológico y serológico.

## Capítulo 9

### 9. Referencias

1. Zwick A, Munir CK, Ryan J. Gastric adenocarcinoma and displasia in fundic gland polyps in a patient with attenuated adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1997; 113: 659-663.
2. Chen R, Ravinovitch PS, Crispin DA, Emond MJ, Bronner MP, Brentnall TA. The initiation of colon cancer in a chronic inflammatory setting. *Carcinogenesis* 2005; 26(9): 1513-9.
3. *Rev Gastroenterol Mex* 2001 Jul-Sep; 66(3): 131-6.
4. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, et al. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med* 2002; 346: 1781-1785.
5. O'Brien MJ, Winawer SJ, Grahan A, Gottlieb LS, Sternberg SS, Díaz B et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990; 98: 371-379.
6. Sanz Ortiz, J. Introducción a la Oncología Clínica. Bases moleculares y terapia integral; 2002.
7. Potter, JD. Colorectal cancer: Molecules and population. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 916-32.
8. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2006*. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
9. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. Edited by: Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK. National Cancer Institute. Bethesda, MD.
10. J. Faerlay, F.Bray, P.Pisani, DM Parkin *Globocan 2000: Cancer incidente, Mortality, and Prevalence Word – wide, Versión 1.0*, International Agency for Research on Cancer (IARC) Cancer Base no. 5, Lyon: IARC Press, 2001.
11. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
12. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Globocan 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*.
13. Ershler WB, Longo DL. Aging and cancer: issues of basic and clinical science. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(20): 1489-97.
14. Tirado-Gómez LL, Betancourt AM. Epidemiology of colorectal cáncer. *Instituto Nacional de Cancerología. Vol. 7, Suplemento 2008*.

15. Lieberman DA. Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Sep 17; 361(12): 1179-87.
16. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, Mcintosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 243-52.
17. SEER Program ([www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov)) SEER\*Stat Database: Incidence. Released April 2005.
18. Fenoglio-Preisser C, Pascal RR, Perzin KH. Adenoma: tumor of the intestines. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology 1990; 105-108.
19. Greeng WP. Colon cancer overview. *Cancer* 1992; 70: 1206-12.
20. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30; 329(27): 1977-81.
21. Ransohoff DF, Sandler RS. Screening for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(1): 40-44.
22. American College of Gastroenterology action plan for colorectal cancer prevention. Rex D.K. *Am J Gastroenterol* 2004 Apr; 99(4): 574-7.
23. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MH, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-1981.
24. Winawer SJ, Fletcher R, Miller L, Godlee F, Stolar M, Mulrow C et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642.
25. Castells A, Bessa X, Daniels M, Ascaso C, Lacy AM, García-Valdecasas JC et al. Value of postoperative surveillance after radical surgery for colorectal cancer. Results of a cohort study. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 714-724.
26. Ahnem DJ, Macrae FA. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Waltham (MA): Uptodate* (2009).
27. Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* 2000; 119: 837-53.
28. Lynch HT, Smyrk T: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Cancer* 1996; 78(6): 1149-67.
29. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 48-59.
30. Doll R, Peto R: The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66(6): 1191-1308.
31. Thomas HJ: Familial colorectal cancer. *Bmj* 1993; 307(6899): 277-278.

32. Parkin y cols, 1992, 1997, 2002; Ponz de León y cols, 1999.
33. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA: Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer* 2001; 37(8): 948-965.
34. World Cancer Research Fund, Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. In.: American Institute for Cancer Research, Washington DC; 1997.
35. Armstrong B, Doll R: Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975; 15(4): 617-631.
36. Mager, D.L. Bacteria and cancer: Cause, coincidence or cure? A review. *Journal of Translational Medicine*, 2006; 4: 14.
37. Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J: Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 387-400.
38. Pujol FH, Devesa M: Genotypic variability of hepatitis viruses associated with chronic infection and the development of hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 611-618.
39. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.
40. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-19.
41. Parsonnet J. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 263-8.
42. Crowe SE: *Helicobacter* infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 1: 32-8.
43. VaishnaviC, Kochhar R, Singh G, Kumar S, Singh S, Singh K: Epidemiology of typhoid carriers among blood donors and patients with biliary, gastrointestinal and other related diseases. *Microbiol Immunol* 2005, 49: 107-112.
44. Littman AJ, White E, Jackson LA, Thornquist MD, Gaydos CA, Goodman GE, Vaughan TL: *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1624-1630.
45. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM: Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127: 80-93.
46. Siegert CE, Overbosch D: Carcinoma of the colon presenting as *Streptococcus sanguis* bacteremia. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1528-1529.
47. Biarc J, Nguyen IS, Pini A, Gosse F, Richert S, Thierse D, Van DA, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Scholler-Guinard M: Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis* 2004, 25: 1477-1484.

48. Schlegel L, Grimont F, Collins MD, Regnault B, Grimont PA, Bouvet A: *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 4: 1425-1434.
49. Parker, M.T., and L. C. Ball: Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *J. Med. Microbiol.* 1976; 9: 275-302.
50. Roses DF, Richman H, Localio SA: Bacterial endocarditis associated with colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1974; 179: 190-191.
51. Gold JS, Bayar S, Salem RR: Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg* 2004; 139: 760-765.
52. Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JI, Steigbigel: Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med* 1977; 297: 800-802.
53. Waisberg J, Matheus CO, Pimenta J. Infectious endocarditis from *Streptococcus bovis* associated with colonic carcinoma: case report and literature review. *Arq Gastroenterol* 2002; 39: 177-80.
54. Ruoff KL, Miller SI, Garner CV, Ferraro MJ, Calderwood SB: Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 305-308.
55. Ellmerich S, Scholler M, Durantion B, Gosse F, Galluser M, Klein JP, Raul F: Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 2000; 21: 753-756.
56. McCoy WC, Mason JM III: Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J Med Assoc State Ala* 1951; 21: 162-166.
57. Zarkin BA, Lillemoe KD, Cameron JL, Effron PN, Magnuson TH, Pitt HA: The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann Surg* 1990; 211: 786-791.
58. Darjee R, Gibb AP. Serological investigation into the association between *Streptococcus bovis* and colonic cancer. *J Clin Pathol* 1993; 46: 1116-19.
59. Schlegel L, Grimont F, Regnault B, Grimont PA, Bouvet A: New group D streptococcal species. *Indian J Med Res* 2004; 119: 252-256.
60. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 487-94.
61. Facklam RR. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl Microbiol* 1972; 23: 1131-9.

62. Tjalsma H, Scholler-Guinard M, Lasonder E, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW: Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: Diagnostic antigens from *Streptococcus bovis*. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 2127-2135.
63. Boleij A, Schaeps MJ, Kleijn S, Hermans PW, Glaser P, Pancholi Vijay, Swinkels DW, Tjalsma H: Surface-exposed Histone-like protein A modulates adherence of *Streptococcus gallolyticus* to colon adenocarcinoma cells. *Infect Immun* 2009.
64. Boissinot M, Ramsay D, Barthe C, Joly JR. Antigenic variability of the outer membrane antigens of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* 1987; 33:607-13.
65. González Sosa. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54(2): 91-5.
66. *Manual of Clinical Microbiology: American Society for Microbiology, Edwin H. Lennette, 1980.*
67. Scholer HI. Diagnosis of cryptococcosis and monitoring of chemotherapy. *Mykosen* 1985; 28(1): 5-10.
68. Clark ML, Price AB, Williams CB. Tumours of the gastrointestinal tract. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA, eds. *Oxford textbook of medicine*. 2nd. Edn. Oxford: Oxford University Press, 1987; 146-58.

## **Capítulo 10**

### **10. Apéndices**

#### **Apéndice A**

##### **Perfil bioquímico de identificación**

- a) Sistema rapid ID32 Strep System: Sistema de identificación para identificación de estreptococos y géneros relacionados filogenéticamente.

## Apéndice B

### Preparación de reactivos y soluciones

#### REACTIVO DE BRADFORD

Disolver 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 (Research Organics) en 50 mL de metanol (CTR Scientific, Mty, México) o etanol absoluto (CTR Scientific, Mty., México), a esta solución se le agregan 100 mL de ácido fosfórico (CTR Scientific, Mty., México) al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 L, conservar el reactivo en frasco oscuro a 4 °C.

**Nota:** Revisar que el azul brillante de Coomassie sea G-250.

#### REACTIVOS PARA ELISA

##### Buffer de carbonatos 0.05 M, pH 9.6 (Diluyente de antígeno)

Pesar 1.59 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Baker Analyzed ACS Reagent, Suwanee, GA, USA), 2.93 g de  $\text{NaHCO}_3$  (Química Meyer, Tláhuac, México), 0.20 g de  $\text{NaN}_3$  (Alfa Aesar, Ward Hill, MA), ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1 L con agua destilada.

##### Buffer de fosfatos 0.05 M (Buffer de lavado)

Pesar a) 30 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Jalmek, Sn Nicolás de los Gza, NL), b) 35.5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Analytika, Mty, NL), agregar 60 mL de la solución a) y 200 mL de la solución b) para obtener un pH de 7.2 a 7.4.

##### Solución reveladora (sustrato)

El cromógeno es altamente sensible a la luz, colocar antes de usar.

#### PREPARACIÓN DE GEL SDS-PAGE

### **Solución Acrilamida-Bis**

Acrilamida 14.6 g, bis-acrilamida (BioRad Laboratories) 0.4 g, agua desionizada 50 mL.

### **SDS al 10%**

SDS 10 g, agua desionizada 100 mL, almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución 1.5M Tris-HCl pH 8.8**

Tris base 18.5 g, agua desionizada 100 mL. Ajustar a pH 8.8 con HCl, almacenar a 4 °C.

### **Solución 0.5M Tris-HCl pH 6.8**

Tris base 6 g, agua desionizada 100 mL. Ajustar a pH 6.8 con HCl, almacenar a 4 °C.

### **Persulfato de amonio al 10%**

Persulfato de amonio 1 g, agua destilada 10 mL. Preparar sólo lo necesario o guardar por 10 días a 4 °C.

## **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS**

### **Buffer para muestras 4X (8 mL)**

Tris HCl 0.5M pH 6.8 0.6 mL del buffer 1.5M, glicerol (Sigma-Aldrich) 0.8 mL, SDS al 10% 1.6 mL de la solución 20%, azul de bromofenol 0.05% 0.4 mL,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.4 mL, agua desionizada 4.2 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

## **ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

### **Buffer de corrida 1X**

Tris base 3 g, glicina 1.44 g, SDS 1 g, agua desionizada 1 L.

### **Buffer de corrida 10X**

Tris base 30 g, glicina 14.4 g, SDS 10 g, aforar a 1 L con agua desionizada.

### **Gel de corrida (10 mL)**

Agua desionizada 4.02 mL, Tris HCl 1.5M pH 8.8 2.5 mL, SDS 10% 0.1 mL, Bis-acrilamida 3.33 mL, TEMED 10 µL, persulfato de amonio (Bio Basic INC) 10% 50 µL.

### **Gel concentrador (5 mL)**

Agua desionizada 3.05 mL, Tris HCl 0.5M pH 6.8 1.25 mL, SDS 10% 50 µL, Bis-acrilamida 650 µL, TEMED (Research Organics) 10 µL, persulfato de amonio 10% 25 µL.

## **TRANSFERENCIA**

### **Buffer de transferencia 5X**

Tris base 3.03 g, glicina 14.4 g, metanol absoluto 200 mL, SDS 0.5 g. Aforar a 1 L con agua desionizada. Ajustar a pH 8.3.

## **WESTERN-BLOT**

### **PBS 10X**

NaCl 80 g, KCl 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g, ajustar pH a 7.4 con HCl, aforar a 1 L con agua destilada.

### **Buffer de lavados PBS-T 1X**

PBS 10X 40 mL, Tritón X-100 2 mL, aforar a 400 mL con agua destilada.

### **Buffer bloqueo en leche**

Leche descremada en polvo 1.2 g, PBS 10X 4 mL, Tritón X-100 0.2 mL, aforar a 40 mL con agua destilada.

### **Solución de Ponceau 0.1%**

Ponceau S 0.2 g, ácido acético 10 mL, aforar a 200 mL con agua destilada.

## **Anticuerpo primario y secundario**

Diluir el anticuerpo en buffer de bloqueo en leche.

## **TINCIÓN CON PLATA**

Ácido acético 5%, metanol 50%, tiosulfato sódico 0.01%, nitrato de plata (DEQ) 0.1%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en formalina 0.04%.

### **Preparación de soluciones stock**

#### **A. Solución I**

Agua destilada 250 mL, metanol 200 mL, ácido acético 50 mL.

#### **B. Solución II**

Agua destilada 425 mL, metanol 50 mL, ácido acético 25 mL.

#### **C. Solución III**

Agua destilada 96 mL, dicromato de potasio 3.53 g. Mezclar 3.33 mL con 7  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado y 30 mL de agua.

#### **D. Solución IV**

Agua destilada 30 mL, nitrato de plata 0.072 g.

#### **E. Solución V**

Agua destilada 500 mL,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  16g. Mezclar 500 $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37% con 23.75 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### **F. Solución VI**

Ácido acético 5%.

## Apéndice C

### Procedimientos

#### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODO BRADFORD

1. Preparar 6 soluciones estándar de 1 mL de 0, 250, 500, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BSA.
2. Mezclar 2 mL de reactivo de Bradford + 100  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar en cubetas o tubos de 13 X 100 limpios, esperar 30 min.
3. Determinar la absorbancia a  $\lambda$  de 595 nm.
4. Graficar la concentración de estándares (eje de las abscisas) contra absorbancia obtenida a una  $\lambda$  de 595 nm (eje de las ordenadas).
5. Obtener la concentración de la muestra con la ecuación de la recta.

#### ELISA PARA DETECCIÓN DE IgG ANTI-*S. bovis*

1. Anotar el orden de las muestras en un formato de placa de ELISA, incluyendo el control positivo, negativo y blanco.
2. Diluir las muestras 1:250 con buffer de lavado o diluyente de muestra.
3. Incubar 60 min a 37 °C.
4. Lavar 3 veces con buffer de lavado.
5. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de conjugado.

6. Incubar 60 min a 37 °C.
7. Lavar 3 veces con buffer de lavado.
8. Agregar 100 µL de sustrato.
9. Incubar 30 min a 37 °C.
10. Añadir 100 µL de solución stop.
11. Leer absorbancia a una  $\lambda$  de 415 nm en el lector de ELISA.
12. Imprimir los resultados.
13. Crear una base de datos en EXCEL.
14. Capturar la absorbancia de cada muestra, de los controles y del blanco, sacar el promedio de cada uno si se puso por duplicado o triplicado.
15. Sacar el valor de RDO para cada muestra,  $RDO = DO \text{ muestra} / DO \text{ del control positivo}$ .
16. Si el valor es igual o mayor a 0.5 se considera positivo.

### **PREPARACIÓN DEL GEL SDS-PAGE**

- a) Limpiar cuidadosamente los vidrios para hacer los geles.
- b) Considerar las cantidades indicadas en la siguiente tabla para la preparación de 2 geles.
- c) En un vial colocar los reactivos para hacer el gel de corrida, agitar suavemente, tener cuidado al poner el persulfato, casi inmediatamente vaciar la solución, ya que se inicia la gelificación en algunos minutos. Dejar reposar 10-15 min para gelificación completa.

d) Posteriormente, preparar en otro vial la solución para el gel concentrador (cuidado al agregar el persulfato, ya que gelificará casi inmediatamente) y colocar el peine, dejar reposar de 10-15 min.

### **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS**

1. Colocar en un tubo eppendorf de 200  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra. Considerar además la muestra del estándar de proteínas que llevará 10  $\mu\text{L}$
2. Agregar el volumen de la proteína equivalente a 50  $\mu\text{g}$ .
3. Hervir en baño maría a 95 °C por 5 min.
4. Hacer lo mismo con 8-10  $\mu\text{L}$  del estándar de peso molecular con 20  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra.
5. Cargar la muestra con jeringa de 50  $\mu\text{L}$ , y lavarla con agua caliente en cada toma de muestra.

### **ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

1. Una vez hechos los geles, quitar los peines a cada uno, con mucho cuidado para mantener los carriles de los pozos.
2. Colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenar con el buffer de corrida en el interior y exterior de los geles.
3. Cargar cada una de las muestras en los carriles del gel, para ello utilizando la jeringa Hamilton, cuidar de lavarla cada que se coloque una nueva muestra.

4. Si quedan carriles sin muestra, agregar sólo buffer de muestra.
5. Correr la electroforesis a 100 V durante 120 min.

## **TRANSFERENCIA**

1. En lo que corre la electroforesis, cortar la membrana de PVDF a la medida del gel aprox. 8 X 6 cm, además cortar 4 papeles filtro (Wathman No. 3) del mismo tamaño. Hacerlo utilizando guantes.
2. Terminado el tiempo de la electroforesis, despegar el gel de los cristales, cortar y desechar el gel de concentración y con mucho cuidado sumergir el gel separador en el buffer de transferencia.
3. Activar la membrana de PVDF colocándola en el buffer de transferencia.
4. Colocar todos los componentes en la unidad de transferencia, a manera de sándwich: esponja/2 papel filtro/gel/membrana/2 papel filtro/esponja.  
Las fibras y el papel filtro se mojan en el buffer de transferencia, antes de acomodarlos.
5. Una vez cerrada la placa de plástico, colocarla en la cámara de transferencia.
6. Llenar la cámara con buffer de transferencia frío.
7. Poner la transferencia a 30 V durante 12 h, para ello se coloca la cámara en un recipiente con hielo.

8. Una vez terminada la transferencia, sacar la membrana con la cara transferida hacia arriba y bloquearla con leche al 3%, 15-20 mL.

## **WESTERN-BLOT**

### **Bloqueo, lavados y colocación de los anticuerpos:**

1. Terminada la transferencia, sacar la membrana con la cara transferida hacia arriba y bloquearla con 15-20 mL de leche al 3% en PBS-Tween 20, durante 1 h a 4°C en agitación constante.
2. Pasado ese tiempo, lavar la membrana con PBS-Tween 20, 2 ó 3 veces para eliminar el exceso de leche, manejando la membrana con pinzas.
3. Poner la dilución a evaluar del anticuerpo primario policlonal (suero del paciente) en buffer de bloqueo en leche, durante 1 h o toda la noche a 4°C y en agitación.
4. Lavar 5 veces 10 min con PBS-Tween 20 en agitación.
5. Poner la dilución a evaluar del anticuerpo secundario (goat anti-human, Sta. Cruz), en buffer de bloqueo en leche, durante 2 h o toda la noche a 4°C y en agitación.
6. Lavar 5 veces 10 min con PBS-Tween 20 en agitación.

### **Revelado**

Cubrir la membrana con una solución de PBS-Tween 20, DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La presencia de las bandas se observará casi inmediatamente como un precipitado marrón. La reacción se detiene con el

buffer de acetatos empleado en la tinción con plata o desechando el revelado y colocando agua destilada.

### **TINCIÓN DE GRAM**

1. Teñir con cristal violeta 1 min.
2. Enjuagar con agua destilada.
3. Cubrir la preparación con solución de lugol y dejar actuar durante 1 min.
4. Enjuagar con agua destilada para eliminar el exceso de lugol.
5. Decolorar con alcohol al 70% durante 10 s.
6. Cubrir la preparación con safranina durante 30 s.
7. Enjuagar con agua destilada.

Dejar secar al aire y observar la preparación con objetivo de 100X.

### **TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON AZUL DE COOMASIE**

#### **Geles SDS-PAGE**

1. Lavar el gel 3 veces con 200 mL de agua destilada por 5 min en cada ocasión.
2. Desechar el agua del paso anterior y agregar 50 mL de Azul de Coomasie Bio-Safe o hasta cubrir el gel. Agitar suavemente durante 1 h. Las bandas de proteínas se harán visibles dentro de 20 min y alcanzarán su máxima intensidad en 1 h aproximadamente. Incubaciones prolongadas con el colorante no incrementarán el fondo.

3. Aclarar el gel con 200 mL de agua destilada por lo menos 30 min. Residuos de SDS en el gel pueden interferir con la tinción del fondo y la intensidad de las bandas. Los geles pueden ser guardados en agua.

### **TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON PLATA**

1. Fijar con **Solución I** por 30 min o toda la noche.
2. Fijar 2 veces con **Solución II** por 20 min cada una.
3. Colocar el gel en **Solución III** por 10 a 30 min.
4. Decolorar el gel con agua destilada cambiando cada 5 a 20 min hasta que se vea transparente.
5. Colocar el gel en **Solución IV** por 20 a 30 min.
6. Lavar con 2 volúmenes de agua destilada de 1 a 2 min. Eliminar el agua.
7. Colocar **Solución V** por 1 o 2 min y agitar.
8. Volver a colocar **Solución V** hasta que se vean las bandas.
9. Detener la reacción con **Solución VI**.
10. Conservar el gel en 7% de glicerol, 10% de etanol.