



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

**PROPUESTA DE UN CONTROL INTERNO PARA WESTERN BLOT  
USANDO SALIVA COMO MUESTRA BIOLÓGICA**

*Proposal of loading control for western blot using saliva samples*

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la Universidad de Talca como parte de los requisitos científicos exigidos para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTES: LIZETTE VÁSQUEZ ORELLANA  
PAULINA ZAPATA MANCILLA  
PROFESOR GUÍA: DR. CÉSAR RIVERA  
PROFESOR CO-GUÍA: DRA. ROMINA HERNÁNDEZ-OLIVOS  
PROFESOR INFORMANTE: DRA. WENDY DONOSO**

**TALCA - CHILE**

**2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## INFORMACIONES CIENTÍFICAS DEL PROFESOR GUÍA

<b>Nombre</b>
César Rivera Martínez
<b>ORCID</b>
0000-0002-5491-4233
<b>Google Scholar</b>
<a href="https://scholar.google.com/citations?hl=es&amp;user=3fWOPJEAAAAJ">https://scholar.google.com/citations?hl=es&amp;user=3fWOPJEAAAAJ</a>
<b>Correo electrónico</b>
<a href="mailto:cerivera@utalca.cl">cerivera@utalca.cl</a>

## **DEDICATORIA**

Al concluir esta etapa de gran aprendizaje, quiero agradecer primero a la vida, porque a pesar de su fragilidad, me ha permitido lograr proyectos tan hermosos como este. A mi familia, mi madre que entregó todo el apoyo incondicional que necesité en todo momento, y quien oraba porque mis días universitarios y los de mis amigos se nos hicieran más fácil. A mi padre quien me inspiró a siempre esforzarme dando lo mejor de mí. A mi hermano mayor quien fue mi ejemplo profesional a seguir, que desde pequeña me impulsó a estudiar, y dar todo por ser la mejor estudiante. A mi novio por apoyarme, amarme y disfrutar juntos el sentido de la investigación. A mis amigos, por aparecer en mi vida, con sus encantos, locuras y cariño, es especial a mi querida co-tesista, quien ha estado desde el primer día de la carrera, juntas hemos pasado penas, alegrías, aciertos y desaciertos. En fin, mis aprendizajes no habrían sido tan gratos sin la compañía de todos ellos.

*Lizette Vásquez*

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mis padres, que gracias a su esfuerzo hoy he caminado tan lejos. A mis hermanas por siempre tener una palabra de aliento y a mi tío Mauri quien creyó en mí, incluso antes de que yo misma lo hiciera. Gracias a todos por su esfuerzo, amor y apoyo, cada logro que tenga no es mío, es nuestro.

*Paulina Zapata*

## **AGRADECIMIENTOS**

Nos gustaría agradecer a todos quienes formaron parte de nuestro periodo de educación universitaria. A nuestras amigas y amigos, con quienes compartimos conocimientos y experiencias. A los docentes que tuvieron la dedicación y paciencia de enseñarnos sus disciplinas. A los funcionarios de la universidad que siempre tuvieron la disposición para solucionar nuestros inconvenientes, junto con entregarnos una palabra de aliento. Y por último agradecer especialmente a nuestro docente guía, quien con dedicación y cariño nos incentivó a creer en nosotras mismas, y a encontrar en la investigación una ventana hacia un nuevo mundo de posibilidades.

*Lizette Vásquez y Paulina Zapata*

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	6
1.1. Palabras clave.....	6
2. ABSTRACT.....	7
2.1. Keywords.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. MÉTODO .....	10
4.1. Diseño general.....	10
4.2. Participantes.....	10
4.3. Biopsia de líquido salival.....	11
4.4. Identificación y priorización de proteínas.....	11
4.5. Proteínas más estables en la saliva.....	12
5. RESULTADOS .....	13
5.1. Identificación de las proteínas salivales.....	13
5.2. PRDX3 mostró la intensidad más estable.....	14
5.3. PRDX3 no es un biomarcador pronóstico de neoplasias malignas.....	15
6. DISCUSIÓN .....	16
7. REFERENCIAS.....	19
8. Anexo.....	22
8.1. Aprobación por un comité de ética acreditado.....	22

## 1. RESUMEN

En la técnica de western blot la existencia de controles internos o proteínas de referencia se utiliza comúnmente para evitar diferencias en las cargas de proteínas. Para los estudios de saliva esta estrategia no es posible ya que aún no se conoce una proteína salival cuya cantidad relativa al contenido de proteína total permanezca constante. Con el objetivo de descubrir una proteína candidata analizamos pools de 105 muestras salivales provenientes de pacientes sanos y con aftas usando un espectrómetro de masas timsTOF (Bruker). Identificamos y cuantificamos los péptidos y proteínas utilizando las herramientas de bioinformática contenidas en FragPipe. Luego con el paquete MSstats de R identificamos las proteínas comunes y que prácticamente no variaban en todas las condiciones evaluadas (*fold change* cercano a cero y un valor-p no significativo). Establecimos 8 candidatas. Para la selección final las proteínas seleccionadas no debían ser marcadores pronósticos de cáncer de acuerdo a la base The Human Protein Atlas. En esta investigación sugerimos que PRDX3 evidencia niveles de abundancia que se mantienen estables bajo diferentes condiciones, pudiendo ser una proteína candidata a ser usada como control interno para experimentos de western blot que tengan como centro la saliva.

### 1.1. Palabras clave

Saliva, proteínas y péptidos salivales, peroxiredoxina III, estándares de referencia, western blotting.

## **2. ABSTRACT**

In the western blot technique, the existence of internal controls or reference proteins is commonly used to avoid differences in protein loads. For saliva studies such strategy is not possible, since it is not yet known one salivary protein which relative amount to total protein content remains constant. In order to discover a candidate protein, we analyzed pools of 105 salivary samples from healthy controls and recurrent aphthous stomatitis patients using a timsTOF mass spectrometer (Bruker). We identify and quantify peptides and proteins using the bioinformatics tools contained in FragPipe. Then, with the MSstats package of R we identified the common proteins that practically did not vary in all the evaluated conditions (fold change close to zero and a non-significant p-value). We established 8 candidates. For the final selection, the selected proteins should not be cancer prognostic markers according to The Human Protein Atlas database. In this research, we suggest that PRDX3 shows levels of abundance that remain stable under different conditions, and may be a candidate protein to be used as an internal control for western blot experiments that have saliva as the center.

### **2.1. Keywords**

Saliva, salivary proteins and peptides, peroxiredoxin III, reference standards, western blot.

### 3. INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido biológico que se forma como un ultrafiltrado del plasma sanguíneo. Debido a su fácil obtención por métodos no invasivos, ha sido blanco de interés diagnóstico (1). La saliva contiene sobre 3.400 proteínas, conjunto conocido como proteoma salival, las que poseen un potencial de diagnóstico emergente (2). El estudio del proteoma salival ha permitido identificar proteínas que pueden ser utilizadas como marcadores de diferentes condiciones de salud y enfermedad, como por ejemplo la caries (3), el virus Zika (4), lesiones premalignas y malignas orales (5).

Los estudios de proteomas se pueden realizar con dos propósitos principales: caracterizar una muestra en particular o comparar muestras de diferentes condiciones experimentales o de salud (6). Independientemente de cuál de estos dos sea el foco, la identificación de proteínas es un aspecto central. En los estudios proteómicos, la electroforesis se acopla con frecuencia a tecnologías de espectrometría de masas. Las proteínas seleccionadas en los geles se escinden y se someten a digestión enzimática en gel (7). En este proceso es importante que cada uno de los puntos (o bandas) extirpados presente la cantidad de proteína suficiente para el análisis de espectrometría de masas.

Una vez identificadas las proteínas, la técnica de western blot tiene un papel de apoyo en la evaluación e identificación de los resultados proteómicos. El western blot es habitualmente requerido por los revisores de investigaciones que utilizan como base la espectrometría de masas (8). Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos disponibles contra las proteínas de interés. Hay algunas particularidades de las muestras de saliva que pueden considerarse para el western blot. Con esta técnica, solo se visualizan manchas o bandas de la proteína que reacciona con el anticuerpo. Cuando se va a realizar una comparación entre diferentes muestras, es importante tener la misma carga de proteína en todos los carriles o geles. Diferentes cargas pueden dar lugar a resultados erróneos. La existencia de controles internos, es decir, proteínas para las que los niveles son proporcionales a la cantidad de proteína total cargada en los geles, es importante y se usa comúnmente para evitar supuestas diferencias en las cargas de proteínas. Proteínas como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), beta-actina o beta-tubulina, se utilizan para corregir la carga de proteínas y factores, como la eficiencia de transferencia (9). El uso simultáneo de un

anticuerpo primario para dicho control interno y el uso de un anticuerpo primario para la proteína de interés puede permitir ajustes: comparando la intensidad de estos controles internos, se puede estimar la cantidad relativa de proteína procesada para cada muestra. Para los estudios de saliva, esta estrategia no es posible, ya que aún no se conoce una proteína salival cuya cantidad relativa al contenido de proteína total permanezca constante. Además hace varios años que existe evidencia de que los genes y proteínas comúnmente utilizados como controles internos pueden ser inadecuados debido a la influencia de varios factores fisiológicos y patológicos en su expresión (9, 10).

Con el objetivo de proponer proteínas salivales que sirvan como control interno o referencia para estudios proteómicos que busquen realizar validaciones con western blot, en esta investigación analizamos pools de muestras salivales provenientes de sujetos sanos y sujetos con estomatitis aftosa recurrente. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de úlceras orales que luego transitan a una fase de curación o remisión total (11). Creemos que la presencia y ausencia de lesiones puede aportar mayor variabilidad y enriquecer nuestra búsqueda de candidatos. En esta investigación un flujo de trabajo, que involucró proteómica basada en espectrometría de masas y bioinformática, nos permitió proponer una proteína candidata debido a la baja variabilidad que presentó en las muestras analizadas.

## **4. MÉTODO**

### **4.1. Diseño general**

Evalúamos el proteoma salival de sujetos sanos y con estomatitis aftosa recurrente (más conocida como aftas) durante la presencia y ausencia de úlceras. Todos los procedimientos fueron de acuerdo con la Declaración de Helsinki (15). El Comité de Ética de la Universidad de Antofagasta (protocolo #156/2018) aprobó esta investigación.

### **4.2. Participantes**

Prospectivamente recolectamos 105 muestras de saliva desde 68 pacientes atendidos en el Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca, entre Marzo y Octubre de 2019. Dividimos a los sujetos en un grupo “control” (n=31, personas sin historial de aftas) y etapa ulcerativa (n=37, personas que al ingreso del estudio presentaron un afta). Estos últimos fueron evaluados también cuando la lesión desapareció, fase llamada “remisión” (n=37). La edad media de los participantes fue de 26 años para ambos grupos, siendo mujeres la mayoría (24 y 27 respectivamente). El perfil de nuestra población concuerda con lo relatado en la literatura internacional, tanto en edad como en la predisposición de aparición de estas lesiones en mujeres (12, 13).

Para ser incluidos, en el momento del examen los pacientes deben haber presentado úlceras durante no más de 2 días. Los criterios de exclusión fueron el uso de medicamentos para tratar las úlceras durante los 2 días anteriores y el uso de corticoides tópicos o sistémicos durante el mes anterior a la entrada en el estudio. Otros criterios de exclusión fueron la presencia de otros tipos de lesiones de la mucosa oral, enfermedades con dolor agudo o crónico, tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol (más de tres veces por semana), síndromes autoinflamatorios, inmunodeficiencias y déficits hematínicos.

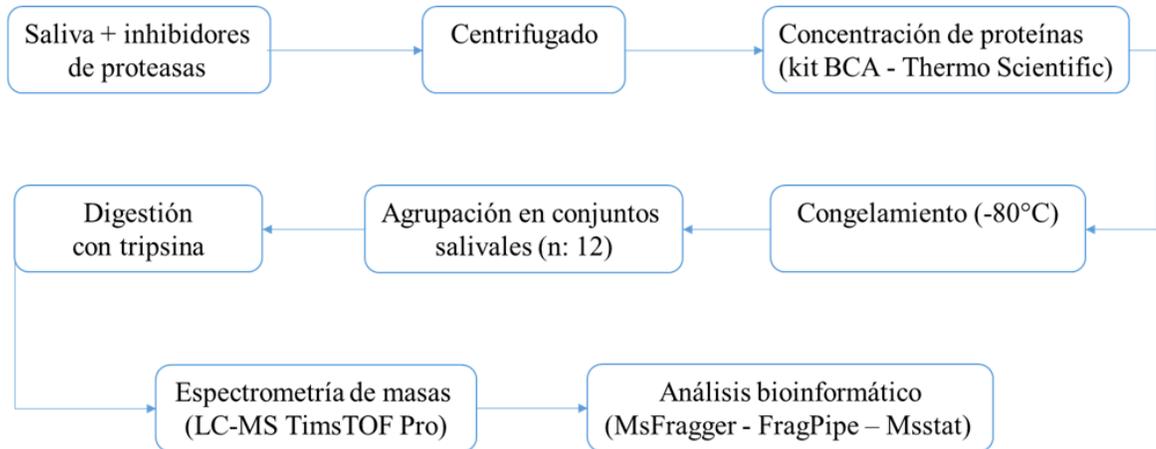
### **4.3. Biopsia de líquido salival**

Se pidió a los sujetos que no comieran ni bebieran durante al menos 30 minutos antes de la recolección. Todos los pacientes se enjuagaron la boca con 10 ml de agua durante 30 segundos. Después de 10 minutos, comenzó la recolección de saliva no estimulada. Entre las 8:00 AM y las 11:00 AM, cada participante esperó continuamente en un tubo estéril de propileno de 50 mL por un período de 10 minutos. Inmediatamente después de la recolección, depositamos las muestras en hielo y añadimos un cóctel de inhibidores de la proteasa (cOmplete Tablets EASYpack, Roche) (16). Luego centrifugamos las muestras a 14.000 g, 4°C durante 20 minutos para eliminar los componentes no disueltos y el detritus celular (17). Determinamos la concentración total de proteínas de los sobrenadantes utilizando el ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific). Después de esto, almacenamos las muestras a -80°C para su posterior procesamiento.

### **4.4. Identificación y priorización de proteínas**

Las muestras de saliva se asignaron al azar y se agruparon en 12 conjuntos: controles sanos (n=3, 11 muestras por conjunto), etapa ulcerativa (n=3, 12 muestras por conjunto) y etapa de remisión (n=3, 12 muestras por conjunto). Cada muestra proporcionó 70 µg de proteína. Los datos de MS se obtuvieron analizando 500 ng de péptidos, después de la digestión trípica y el fraccionamiento de los péptidos, utilizando un sistema LC nanoElute acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Bruker Daltonics). Una descripción detallada del instrumento está disponible en la ref. (18). Los archivos en bruto de MS fueron procesados con MsFragger a través de Fragpipe. La cuantificación de proteínas sin etiqueta se realizó con el algoritmo IonQuant como se ha descrito anteriormente (19). Utilizamos MSstats (20) para calcular las abundancias de proteína basadas en las abundancias de iones reportadas por MsFragger. (ver diagrama de proceso en figura 1). Seguimos el análisis general del flujo de trabajo para los experimentos de adquisición dependiente de datos (DDA o shotgun) (21). La función dataProcess con transformación de intensidad log<sub>2</sub> se utilizó para calcular las abundancias de proteínas. Consideramos aquellas proteínas salivales sin cambios

significativos, con una tasa de cambio o *fold change*  $\log_2$  mayor que -0,02 y menor que 0,02 con un valor  $p \geq 0.95$  al comparar entre grupos (prueba t de Student).



**Figura 1.** Diagrama de procesamiento de muestras salivales, desde su almacenamiento posterior a la recolección, hasta la obtención de datos de los softwares de bioinformática.

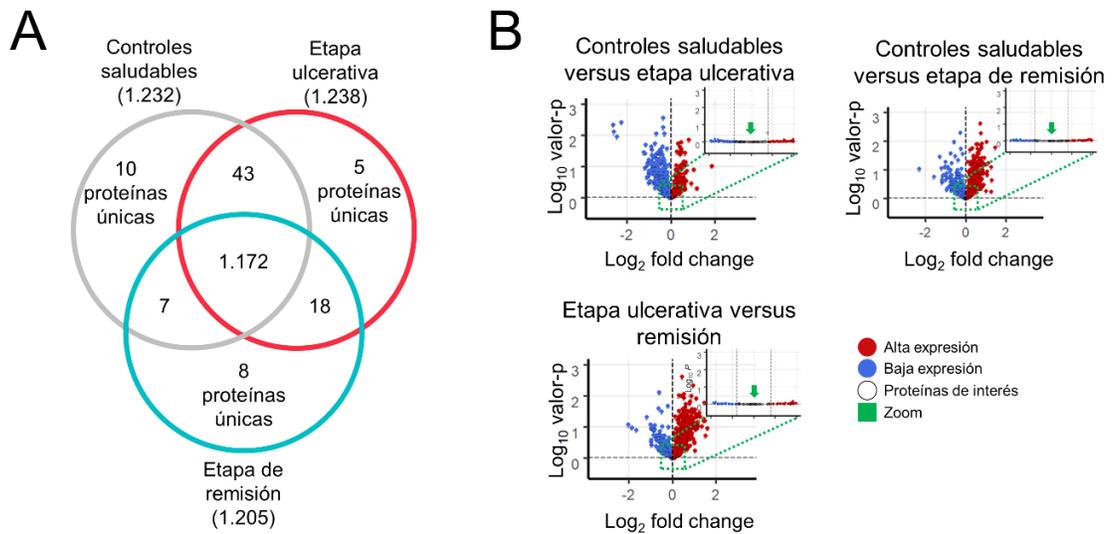
#### 4.5. Proteínas más estables en la saliva

Las proteínas salivales más estables sin cambios significativos, se importaron a una base de datos para mantener exclusivamente las proteínas que se encontraban presentes en todos los contrastes (controles saludables, etapa ulcerativa y remisión). De las proteínas obtenidas se mantuvieron sólo aquellas que no fuesen un biomarcador de cáncer, de acuerdo con The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificación de las proteínas salivales

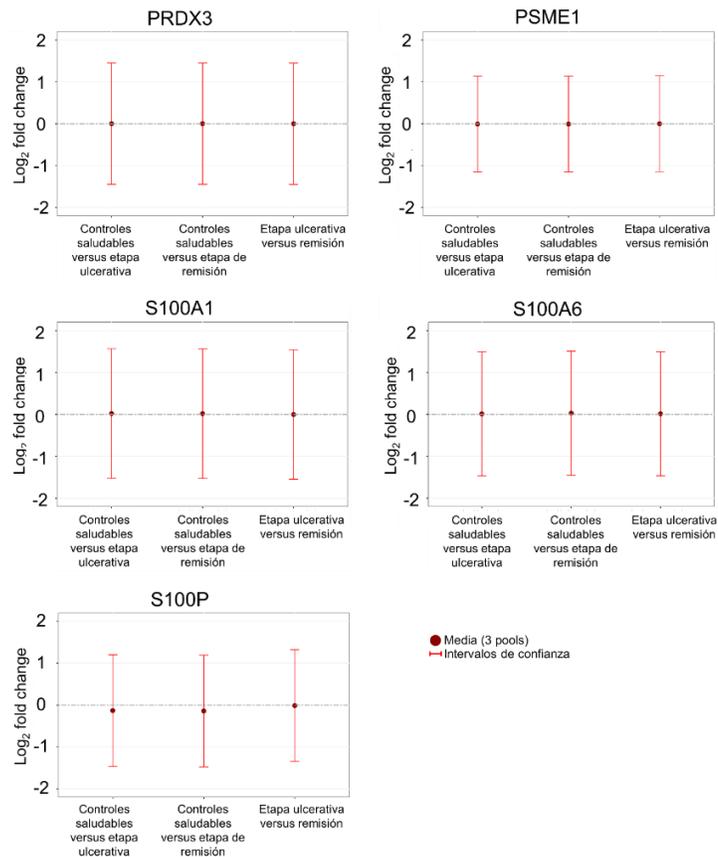
Para identificar las proteínas salivales en salud, úlcera activa y remisión, preparamos 3 sets de muestras combinadas (pools) cada estado, cada uno de ellos conteniendo un tercio de los sujetos. Luego de identificar las proteínas mediante un flujo de espectrometría de masas y bioinformática, nos concentramos en las más de mil proteínas en común coincidentes entre todos los grupos (Figura 3A). Nuestro interés estuvo en las proteínas cuya abundancia mostró una menor variabilidad entre los pools, con tasas de cambio muy cercanas a cero y un valor-p no significativo en los contrastes (área gris de los gráficos de volcán en la Figura 3B). En el Archivo Suplementario 1 (<https://bit.ly/suplementario1>), puede consultarse el listado completo de proteínas identificadas y cuantificadas.



**Figura 2.** Proteoma salival. (A) El diagrama de Venn muestra que la mayoría de las proteínas salivales identificadas fueron proteínas en común. (B) Los gráficos de volcán muestran las ventanas consideradas en el análisis, construidas considerando la significancia estadística y el *fold change*. En el centro de cada gráfico realizamos un zoom para mostrar los límites de nuestras proteínas de interés. Los límites del *fold change* fueron -0,02 y 0,02. El valor-p establecido fue 0,95.

## 5.2. PRDX3 mostró la intensidad más estable

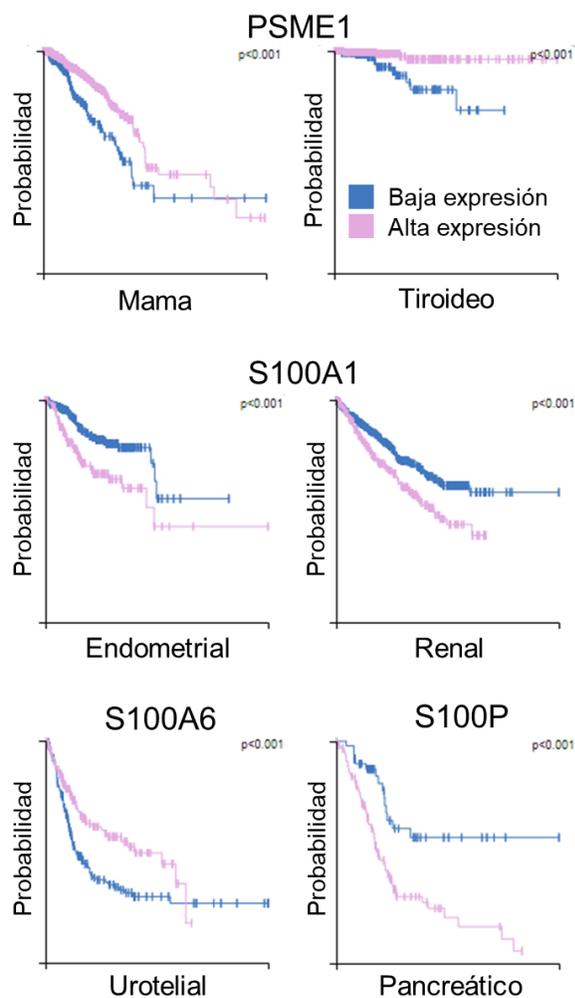
Las proteínas más relevantes para nuestro estudio no debían presentar cambios significativos en términos de abundancia. Mantuvimos 258 proteínas luego de aplicar nuestra ventana de análisis. Luego verificamos aquellas candidatas que estuvieran presentes no solo en cada grupo, sino que además en cada pool (en el 100% de las muestras). Sólo 5 proteínas se mantuvieron en la lista, PRDX3, PSME1, S100A1, S100A6 y S100P. La Figura 4 muestra el *fold change* al comparar la abundancia de cada proteína entre los grupos. De todas ellas, PRDX3 fue la proteína cuya intensidad presentó una menor variación entre las muestras. El Archivo Suplementario 1 (<https://bit.ly/suplementario1>) contiene los valores de cada uno de los contrastes.



**Figura 3.** PRDX3 fue la proteína con la intensidad menos variable. Gráficos de comparación que demuestran la intensidad de las proteínas en cada uno de los contrastes. Las más estables son PRDX3 y S100A6. Los puntos indican la media de la relación logarítmica y las barras de error tienen intervalos de confianza con un nivel significativo de 0,95 para cada condición.

### 5.3. PRDX3 no es un biomarcador pronóstico de neoplasias malignas

Las proteínas usadas como control endógeno pueden variar ante múltiples estímulos biológicos o condiciones patológicas (14), incluyendo el cáncer (15). Para elegir un candidato con una oportunidad de una menor variación biológica consultamos The Human Protein Atlas (Pathology Atlas). Este análisis permitió establecer que el único producto genético no pronóstico correspondió a PRDX3 (Figura 5).



**Figura 4.** Todos los candidatos son pronósticos en cáncer, salvo PRDX3. Gráficos de supervivencia que asocian la expresión del mRNA de las moléculas candidatas y la supervivencia de los pacientes a los 5 años. Los sujetos fueron divididos en dos grupos, de alta y baja expresión. Se usó el test Log-rank con un valor-p significativo <0,001. La alta expresión de PMSE1 es favorable en cáncer de mama y tiroides. La alta expresión de S100A1 es desfavorable en cáncer de endometrio y renal. Una alta expresión de S100A6 es favorable para el cáncer urotelial. La alta expresión de S100P es desfavorable en el cáncer de páncreas.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio mostramos con una técnica analítica de alta capacidad que la proteína PRDX3 presenta poca variabilidad en la saliva de pacientes sanos y enfermos. Ello pone a esta proteína como un potencial marcador de control de carga en experimentos de western blot donde la saliva sea la muestra a evaluar.

Las investigaciones que evalúan la presencia o intensidad relativa de bandas de proteínas mediante western blot, lo hacen utilizando estándares internos de proteínas que no varían frente a condiciones experimentales, fisiológicas o patológicas. Esto es particularmente difícil para la saliva, que presenta un proteoma altamente variable. La secreción de las proteínas salivales está bajo un control neurológico. Sus proteínas son modificadas por enzimas del hospedero y bacterias orales, en un entorno dinámico de síntesis y eliminación por deglución (16). Conscientes de ese ambiente, en nuestra investigación sumamos aún una mayor variabilidad, la de evaluar la saliva sujetos sanos y sujetos con lesiones recurrentes mediadas por el sistema inmunológico, tanto en fases de ulceración y remisión total. Creemos que esta mayor dificultad técnica nos permite obtener una mayor confiabilidad en nuestros resultados. Entendemos que una proteína invariable pese a todo, e identificada por proteómica basada en espectrometría de masas, será un buen candidato a un control de referencia interno.

Nosotros identificamos que PRDX3 fue una de las proteínas salivales que presentó la menor variabilidad en todos los contrastes de los sets estudiados. Las muestras fueron inicialmente analizadas con un espectrómetro de masas, de alta resolución y alta precisión timsTOF de Bruker, en un flujo de trabajo que combinó la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS). Este instrumento es muy atractivo para estudios proteómicos con cantidades de proteínas extremadamente bajas, por ejemplo, biopsias tumorales micro-disecadas, y para aplicaciones clínicas de proteómica de alto rendimiento (17). Luego usando FragPipe y MSStats obtuvimos el *fold-change* en los contrastes entre grupos. El *fold-change* es un valor que informa cuánto cambia una cantidad desde un estado a otro. Es usado en proteómica para evaluar la expresión diferencial de proteínas (18) e identificación de biomarcadores de enfermedades (19). A partir de esos valores, nos

concentramos en aquellas proteínas que se mantuvieron prácticamente constantes en todos los pools de muestras: PRDX3, PSME1, S100A1, S100A6 y S100P. De ellas, PRDX3 lideró la menor variabilidad. Usando instrumentos menos sensibles, la LC-MS/MS se ha usado recientemente para la resolver el problema de normalización de proteínas en western blot. Se identificó que la abundancia de la proteína celular parkinson disease 7 (PRK7 o DJ-1) fue la de menor variabilidad en células humanas, de ratón y anfibio, lo que fue validado posteriormente con western blot (8).

El hecho de que aún no validemos nuestra candidata mediante western blot es nuestra mayor limitación y punto pendiente. La espectrometría de masas tiene una gran ventaja sobre los métodos basados en anticuerpos usados convencionalmente, como el western blot, en términos de una mayor especificidad, linealidad, reproducibilidad y límites típicos de cuantificación muy bajos, en rangos de femtomol (fmol) (20). Pese a ello nosotros queremos una proteína de referencia para pruebas que usen la saliva como fuente biológica.

La peroxiredoxina (PRDX) es una familia ubicua de enzimas peroxidasa que desempeñan un papel dominante en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y la protección contra el estrés oxidativo intracelular (21). Las isoformas de PRDX se expresan en gran medida en los tejidos humanos, dentro de las células, influyendo en varios procesos celulares. PRDX3, que se localiza específicamente en la matriz mitocondrial, juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (22). PRDX3 fue identificada recientemente en forma soluble a partir de análisis proteómico de vesículas extracelulares en lágrimas de pacientes con síndrome de Sjögren (23). Las vesículas extracelulares son estructuras delimitadas por bicapas lipídicas que se liberan naturalmente de una célula (24). Están presentes en fluidos biológicos y participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Las vesículas extracelulares se consideran un mecanismo adicional para la comunicación intercelular, permitiendo que las células intercambien proteínas, lípidos y material genético (25). El hecho de haber identificado a PRDX3, una proteína de compartimentos intracelulares, en la saliva de los pools estudiados podría explicarse por la presencia de vesículas extracelulares que la contienen.

PRDX-3 no es un marcador de pronóstico clínico de cáncer. Los objetivos de nuestras investigaciones apuntan a presentar la saliva como un fluido con utilidad clínica. Pese a que PRDX-3 se ha demostrado sobrerregulado en tejidos y células de cáncer de mama (26), cervical (27), hígado (28) y de próstata (29), The Human Protein Atlas no le otorga un valor clínico en términos de supervivencia de pacientes con cáncer. En contraste el atlas sí lo hace para PSME1, S100A1, S100A6 y S100P. The Human Protein Atlas se creó para producir anticuerpos frente a dianas proteicas humanas correspondientes a todos los genes codificadores de proteínas y para cartografiar la expresión de éstas en tejidos humanos normales, cáncer y células (30). Es una herramienta para facilitar estudios sobre biomarcadores clínicos y ella no le otorga un rol pronóstico, favorable o desfavorable, a PRDX3. Este fue otro de los puntos que nos hizo inclinarnos por esta proteína y proponerla como candidato a referencia en experimentos que involucren western blot.

En esa investigación nuestros datos soportan de forma acumulativa la existencia de proteínas cuyos niveles de abundancia se mantienen prácticamente constantes, pese al entorno dinámico oral y la existencia o no de lesiones orales. Desde una perspectiva clínica, sugerimos una proteína como control interno para experimentos que tengan como centro la saliva, tanto en salud o enfermedad. Está pendiente verificar la presencia de esta proteína mediante el uso de anticuerpos y ampliar las muestras a otros estados patológicos y rangos etarios.

## 7. REFERENCIAS

1. Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messina I, Cabras T, Iavarone F, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017;37(2):94-101. doi: 10.14639/0392-100x-1598.
2. Sivadasan P, Gupta MK, Sathe GJ, Balakrishnan L, Palit P, Gowda H, et al. Human salivary proteome--a resource of potential biomarkers for oral cancer. *J Proteomics.* 2015;127(Pt A):89-95. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.039.
3. Hegde MN, Attavar SH, Shetty N, Hegde ND, Hegde NN. Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2019;22(1):2-6. doi: 10.4103/jcd.Jcd\_531\_18.
4. Zuanazzi D, Arts EJ, Jorge PK, Mulyar Y, Gibson R, Xiao Y, et al. Postnatal Identification of Zika Virus Peptides from Saliva. *J Dent Res.* 2017;96(10):1078-84. doi: 10.1177/0022034517723325.
5. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One.* 2010;5(6):e11148. doi: 10.1371/journal.pone.0011148.
6. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics.* 2009;2009. doi: 10.4061/2009/239204.
7. Paulo JA. Sample preparation for proteomic analysis using a GeLC-MS/MS strategy. *J Biol Methods.* 2016;3(3). doi: 10.14440/jbm.2016.106.
8. Wiśniewski JR, Mann M. A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting. *J Proteome Res.* 2016;15(7):2321-6. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00403.
9. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* 2005;5(2):566-71. doi: 10.1002/pmic.200400941.
10. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 1999;75(2-3):291-5. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7.

11. Rivera C. Essentials of recurrent aphthous stomatitis (Review). *Biomed Rep.* 2019;11(2):47-50. doi: 10.3892/br.2019.1221.
12. Queiroz S, Silva M, Medeiros AMC, Oliveira PT, Gurgel BCV, Silveira E. Recurrent aphthous ulceration: an epidemiological study of etiological factors, treatment and differential diagnosis. *An Bras Dermatol.* 2018;93(3):341-6. doi: 10.1590/abd1806-4841.20186228.
13. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Mucosal disease series. Number VI. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* 2006;12(1):1-21. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01143.x.
14. Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci.* 2013;92(13):747-51. doi: 10.1016/j.lfs.2013.02.014.
15. Hu X, Du S, Yu J, Yang X, Yang C, Zhou D, et al. Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better "housekeeper". *Oncotarget.* 2016;7(41):66679-88. doi: 10.18632/oncotarget.11439.
16. Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res.* 2007;86(8):680-93. doi: 10.1177/154405910708600802.
17. Meier F, Brunner AD, Koch S, Koch H, Lubeck M, Krause M, et al. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(12):2534-45. doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
18. Kammers K, Cole RN, Tiengwe C, Ruczinski I. Detecting Significant Changes in Protein Abundance. *EuPA Open Proteom.* 2015;7:11-9. doi: 10.1016/j.euprot.2015.02.002.
19. Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, Anthwal S, Strahler JR, Walker A, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *J Proteome Res.* 2006;5(5):1143-54. doi: 10.1021/pr050455t.
20. Jayasena T, Poljak A, Braidy N, Zhong L, Rowlands B, Muenchhoff J, et al. Application of Targeted Mass Spectrometry for the Quantification of Sirtuins in the Central Nervous System. *Sci Rep.* 2016;6:35391. doi: 10.1038/srep35391.
21. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life.* 2001;52(1-2):35-41. doi: 10.1080/15216540252774748.

22. Chen L, Na R, Gu M, Salmon AB, Liu Y, Liang H, et al. Reduction of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by overexpressing peroxiredoxin 3 improves glucose tolerance in mice. *Aging Cell*. 2008;7(6):866-78. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00432.x.
23. Aqrabi LA, Galtung HK, Vestad B, Øvstebø R, Thiede B, Rusthen S, et al. Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):14. doi: 10.1186/s13075-017-1228-x.
24. Iwai K, Minamisawa T, Suga K, Yajima Y, Shiba K. Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:30829. doi: 10.3402/jev.v5.30829.
25. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-28. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
26. Chua PJ, Lee EH, Yu Y, Yip GW, Tan PH, Bay BH. Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer. *Int J Oncol*. 2010;36(2):359-64.
27. Kim K, Yu M, Han S, Oh I, Choi YJ, Kim S, et al. Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2009;21(6):1391-6.
28. Choi JH, Kim TN, Kim S, Baek SH, Kim JH, Lee SR, et al. Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin III in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res*. 2002;22(6a):3331-5.
29. Ummanni R, Barreto F, Venz S, Scharf C, Barrett C, Mannsperger HA, et al. Peroxiredoxins 3 and 4 are overexpressed in prostate cancer tissue and affect the proliferation of prostate cancer cells in vitro. *J Proteome Res*. 2012;11(4):2452-66. doi: 10.1021/pr201172n.
30. Kampf C, Bergman J, Oksvold P, Asplund A, Navani S, Wiking M, et al. A tool to facilitate clinical biomarker studies--a tissue dictionary based on the Human Protein Atlas. *BMC Med*. 2012;10:103. doi: 10.1186/1741-7015-10-103.

## 8. Anexo

### 8.1. Aprobación por un comité de ética acreditado



CEIC REV /2018  
Nº de folio: 156/2018

#### CERTIFICADO DE EVALUACION ETICA DE PROYECTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA

En Antofagasta, a 019 días del mes de noviembre de 2018 se ha reunido la Comisión de ética en Investigación Científica (CEIC-UA) de la Universidad de Antofagasta constituida por los miembros abajo firmantes, para evaluar el Proyecto de Investigación:

**“Descubrimiento de biomarcadores con utilidad clínica para la estomatitis aftosa recurrente usando saliva como biopsia líquida y proteómica basada en espectrometría de masas.”**

**Fondecyt de Iniciación Nº 11180170**

Cuyo Investigador Principal es:

**César Andrés Rivera Martínez**

El autor de la investigación, viene a declarar que el proyecto identificado en este documento, se realizará mediante evaluación de saliva de pacientes con y sin estomatitis aftosa y aplicación de cuestionario. Para ello cautela principios éticos fundamentales en la investigación de carácter biomédico con personas. Se compromete además a respetar la confidencialidad de datos personales y al uso obligatorio de consentimiento informado.

Lo anterior ha sido corroborado por esta Comisión y ha procedido a evaluar el Protocolo presentado por el Tutor. Dicha evaluación ha demostrado que el estudio propuesto, **cautela los principios éticos y legales que deben regir las investigaciones de biomedicina con personas.**

**Cabe mencionar que esta documentación otorgada, será usada como base para eventual seguimiento e informe final de aspectos éticos en el desarrollo de la investigación.**

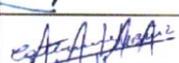
**El investigador se compromete a informar de cualquier modificación con relación a su estudio, la cual se debe realizar mediante documentación escrita y firmada a este CEIC.**

Se extiende el presente certificado para los fines que el investigador considere pertinente.



COMITÉ ACREDITADO POR LA SEREMIA DE SALUD DE ANTOFAGASTA EN CONFORMIDAD A LA RESOLUCION EXENTA 7298 /  
22.10.15

**HOJA DE FIRMAS INTEGRANTES CEIC-UA**

NOMBRE	FUNCION	FIRMA
Julio Alfaro Toledo	Presidente Magíster en Bioética	
Iván Neira Cortes	Vicepresidente Dr. en Ciencias	
Pedro Cortes Olivares	Secretario de Actas Dr. en Estadística	
Joel Bravo Bown	Director Bioseguridad Cirujano Dentista	
Daniella Piantini Montivero	Abogada	
Francisco Sepúlveda Sánchez	Médico Veterinario	
Guido Solari Montenegro	Dr. en actividad física	
Catherine Urbina Pizarro	Periodista	
Barnett Bustamante López	Ecólogo Marino Magíster	
Manuel Figueroa Sánchez	Químico Farmacéutico Magíster	
Catherine Lizama Jiménez	Dra. En Cs. Biológicas	
Janetti Signorelli Sentis	Dra. en Cs. Biológicas	
Robert Mattatal Lankin	Representante de la Comunidad	

