

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA EDUCACIÓN
UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE FLUIDOS DE
QUISTES DE MAMA EN PACIENTES DEL SEGURO SOCIAL DE LA
CIUDAD DE VALERA**

www.bdigital.ula.ve

Autoras:

Abou Amer Juhayna

Cabrita Silvia

Tutor: Dr. Gerardo Medina

Cotutor: Prof. Efrén Andrades

Noviembre, 2014.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por mantenernos de pie ante cualquier reto, llenándonos de sabiduría en el transcurso de esta carrera, sirviéndonos de guía en la toma de las mejores decisiones y sobre todo por permitirnos estar a solo un paso de cumplir este gran sueño.

A **nuestros Padres**, quienes nos apoyaron en todo momento, inculcándonos valores, brindándonos la oportunidad de recibir una excelente educación en el transcurso de nuestras vidas, siendo ejemplo de vida a seguir.

A **nuestras hermanas y hermanos**, por ser parte importante de nuestras vidas y representar la unidad familiar, el desarrollo profesional digno de admirar; por darnos alegría y amor cuando más lo necesitamos.

A la **ilustre Universidad de Los Andes**, nuestra casa de estudio, por habernos dado el conocimiento ético y profesional.

Al **personal, de la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis**, por habernos brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo, facilitándonos todos los recursos necesarios para el mismo.

A la **cátedra de Citología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis**, por la experticia aportada por sus docentes.

Al **personal de salud** del Hospital "Dr. Luis Razetti" y el Hospital Anticanceroso "Rafael Isidro Briceño", ubicados en Barinas y Valera, respectivamente, por el aporte del material biológico necesario para el desarrollo de esta investigación.

A **nuestro tutor Gerardo Medina**, por transmitirnos su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que nos ayudaron a seguir formándonos como personas e investigadoras prendiendo la llama de la genialidad en algunos instantes.

A **nuestro cotutor Efrén Andrade**, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia y solidaridad permitió la culminación de esta investigación con éxito.

A **los profesores Cristina Grassi y Manuel Jiménez**, por ser una guía complementaria en la realización de la parte experimental de este estudio.

A **Diana Ocampo**, ser humano digno de admirar y amar, ejemplo de lucha y perseverancia, por ser más que una amiga, una madre en la cual apoyarnos. Este triunfo también es tuyo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	15
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo General	22
4.2. Objetivos Específicos	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Material Biológico	23
5.2. Metodología	26
5.2.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bollag y col., 1996)	26
5.2.2. Espectrofotometría	32
5.2.3. Evaluación de actividad proteasa en placas de agarosa	32
6. RESULTADOS	39
6.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida	40
6.1.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en tres geles de poliacrilamida (A1, A2 y A3) al 10%	40
6.1.1.1. Evaluación de las muestras de los fluidos de quistes sembradas en geles de poliacrilamida al 10%	42
6.1.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (B1, B2 y B3) al 12,5% del fluido de quiste de mama	44
6.1.2.1. Evaluación de las muestras de los fluidos de quistes sembradas en geles de poliacrilamida al 12,5%	46
6.2. Determinación de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos usando el método de espectrofotometría	49
6.3 Determinación de la actividad específica proteasa de los fluidos de quistes de mama usando geles de agarosa.	51

6.3.1. Elección de sustrato (tipo y concentración) y buffer	52
7. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	60
7.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	60
7.2 Espectrofotometría	61
7.3 Actividad específica proteasa	61
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
8.1. Conclusiones	63
8.2. Recomendaciones	66
9. REFERENCIAS	67
10. ANEXOS	73
ANEXO A. Curvas usadas como patrón para la estimación de los pesos moleculares de las muestras de quiste de mama sembradas en geles de acrilamida a concentraciones de 10% y 12,5%	74
ANEXO B. Tabla para la determinación de concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos por Warburg y Christian (1941)	82
ANEXO C. Ensayos donde se evidencia la presencia de halos turbios y claros	84
ANEXO D. Aportes del estudio	91

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE FIGURAS

	pp.
Figura	
1. Glándula Mamaria	1
2. Estructura molecular de una proteína	7
3. Jerarquía estructural de las proteínas	8
4. Electroforesis en gel poliacrilamida	13
5. Electroforesis desnaturalizante en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE	14
6. Esquema general de trabajo	23
7. Técnica de punción-aspiración con aguja fina (PAAF)	25
8. Preparación de las soluciones para aplicar el método de electroforesis desnaturalizante	28
9. Composición de geles para SDS-PAGE	29
10. Ensayo de difusión con placas de agarosa	41
11. Descarte de variables	34
12. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A1) de fluidos de quiste de mama	35
13. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A2) de fluidos de quiste de mama	41
14. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A3) de fluidos de quiste de mama	42
15. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B1) de fluidos de quiste de mama	45
16. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B2) de fluidos de quiste de mama	45
17. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B3) de fluidos de quiste de mama	47
18. Esquema de elección del sustrato	52
19. Esquema de elección de la concentración del sustrato	53

20. Evidencia de halos de actividad en los buffers	54
21. Evidencia de halos de actividad en el ananase	54
22. Actividad proteasa muestras 1B, 2B y 3B conc. 0,31g sin buffer	85
23. Actividad proteasa muestras 4V, 5V y 6V conc. 0,31g sin buffer	85
24. Actividad proteasa muestras 7V, 8V y 9V conc. 0,31g sin buffer	85
25. Actividad proteasa muestras 10V, 11V y 12V conc. 0,31g sin buffer	86
26. Actividad proteasa muestras 1B, 2B y 3B conc. 0,62g sin buffer	86
27. Actividad proteasa muestras 4V, 5V y 6V conc. 0,62g sin buffer	86
28. Actividad proteasa muestras 7V, 8V y 9V conc. 0,62g sin buffer	87
29. Actividad proteasa muestras 10V, 11V y 12V conc. 0,62 g sin buffer	87
30. Actividad proteasa muestras 1B, 2B y 3B conc. 0,31g con buffer	87
31. Actividad proteasa muestras 4V, 5V y 6V conc. 0,31g con buffer	88
32. Actividad proteasa muestras 7V, 8V y 9V conc. 0,31g con buffer	88
33. Actividad proteasa muestras 10V, 11V y 12V conc. 0,31 g con buffer	88
34. Actividad proteasa muestras 1B, 2B y 3B conc. 0,62g con buffer	89
35. Actividad proteasa muestras 4V, 5V y 6V conc. 0,62g con buffer	89
36. Actividad proteasa muestras 7V, 8V y 9V conc. 0,62g con buffer	89
37. Actividad proteasa muestras 10V, 11V y 12V conc. 0,62 g con buffer	90
38. Control de ensayo de actividad proteasa	90
39. Aplicación de métodos analíticos	92
40. Método de actividad específica proteasa por descarte de variables	93

LISTA DE GRÁFICOS

	pp.
GRÁFICO	
1. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel A1 al 10%	74
2. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel A2 al 10%	76
3. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel A3 al 10%	77
4. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel B1 al 12,5%	79
5. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel B2 al 12,5%	80
6. Curva de calibración de los PM en función de RF para el gel B3 al 12,5%	81

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE TABLAS

	pp.
TABLA	
1. Pesos moleculares de proteínas usadas como referencia	32
2. Nomenclatura de las muestras de quistes de mama	40
3. Pesos moleculares obtenidos por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE al 10% de los fluidos de quistes de mama estudiados	43
4. Pesos moleculares obtenidos por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE al 12,5% de los fluidos de quistes de mama estudiados	47
5. Determinación de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos por el método de Warburg y Christian	50
6. Nomenclatura y aspecto de las muestras del fluido de quistes de mamas	51
7. Actividad específica para 10 µl, sin buffer y 0,31g de sustrato	56
8. Actividad específica para 8 µl, con buffer y 0,31g de sustrato	57
9. Actividad específica para 10 µl, sin buffer y 0,62g de sustrato	58
10. Actividad específica para 8 µl, con buffer y 0,62g de sustrato	59
11. Marcadores de peso molecular del gel A1 al 10%	75
12. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel A1	75
13. Marcadores de peso molecular del gel A2 al 10%	76
14. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel A2	76
15. Marcadores de peso molecular del gel A3 al 10%	77
16. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel A3	78
17. Marcadores de peso molecular del gel B1 al 12,5%	78
18. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel B1	79
19. Marcadores de peso molecular del gel B2 al 12,5%	79

20. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel B2	80
21. Marcadores de peso molecular del gel B3 al 12,5%	81
22. Rf y peso molecular de las muestras de quistes de mama del gel B3	81
23. Tabla para determinar las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos por Warburg y Christian (1941)	83

www.bdigital.ula.ve

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA EDUCACIÓN UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE FLUIDOS DE QUISTES DE MAMA EN PACIENTES DEL SEGURO SOCIAL DE LA CIUDAD DE VALERA

Autoras: Abou Amer Juhayna
Cabrita Silvia

Tutor: Dr. Gerardo Medina

Cotutor: Prof. Efrén Andrades

Mes y Año: noviembre, 2014.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general evaluar el perfil proteico y la actividad específica proteasa en fluidos de quiste de mama. Metodológicamente, la investigación es experimental; se usan tres métodos de análisis químico a saber: electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida, para identificar el contenido proteico del material biológico; la espectrofotometría que permite cuantificar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras y por último, la técnica de placas de agarosa para la determinación de actividad específica proteasa. Se examinaron doce (12) muestras provenientes seguro social "Juan Montezuma Giannary" de la ciudad Valera-Edo. Trujillo. Los resultados obtenidos al aplicar el primer método fueron dos patrones de bandeo característicos de los geles de resolución al 10% y 12,5%, conformados por 13 y 9 bandas a través de las cuales se identificaron 3 macromoléculas; Lisozima, Zn- α 2-glicoproteína y Albúmina cuyos pesos moleculares fueron 14,3 KDa, 39 KDa y 68 KDa. De ellas, la primera proteína se relacionó con cáncer de mama y las dos últimas forman parte de la composición de los fluidos de quiste de mama estudiados por Celis y Cols. (2008). Con la espectrofotometría se obtuvo la concentración de proteínas y ácidos nucleicos de las muestras, donde se observó que la muestra 12V presentó en mayor proporción estos valores (186 mg/ml y 6,5 mg/ml). cabe destacar que la contribución de este estudio se evidenció al utilizar los resultados anteriores como valores de entrada para determinar la actividad específica proteasa de las proteínas presentes en fluidos de quistes de mama. luego de usar las placas de agarosa en condiciones ensayadas de temperatura (-4°C), tipo de sustrato y concentración (leche karla: 0,31g - 0,62g), así como el pH del buffer (8,6) y el tiempo de reacción (24 horas) para visualizar la formación de halos, se halló el marcador actividad específica proteasa por medio del cual se determinó que las muestras que presentaron mayor pureza fueron la 1B, 5V y 11V. De igual forma la muestra 12V fue la que presentó menor actividad y una expresión molecular de menor cantidad de proteína por mayor cantidad de ácidos nucleicos.

Descriptores: Perfil proteico, actividad específica proteasa, métodos analíticos.

1. INTRODUCCIÓN

Las mamas son dos glándulas situadas simétricamente en relación con la línea mediana, en la cara anterior y superior del tórax. Cada una tiene exteriormente el aspecto de una eminente carnosidad de tamaño y turgencia variable, coronada por una estructura de pigmentación oscura en forma de disco (areola) con centro sobreelevado (pezón), donde se abren una cantidad variable de poros lactíferos (de 12 a 18) formando lo que se conoce como conjunto areola-pezón (Latarjet y Ruiz, 2004). Además, las glándulas mamarias contienen vasos arteriales, venosos y linfáticos, así como elementos nerviosos. (Tapia, 2007)

Ulrich (2006) destaca que el componente más importante de la mama es el cuerpo glandular mamario. El mismo está formado por tejido conjuntivo, adiposo y las estructuras glandulares epiteliales.

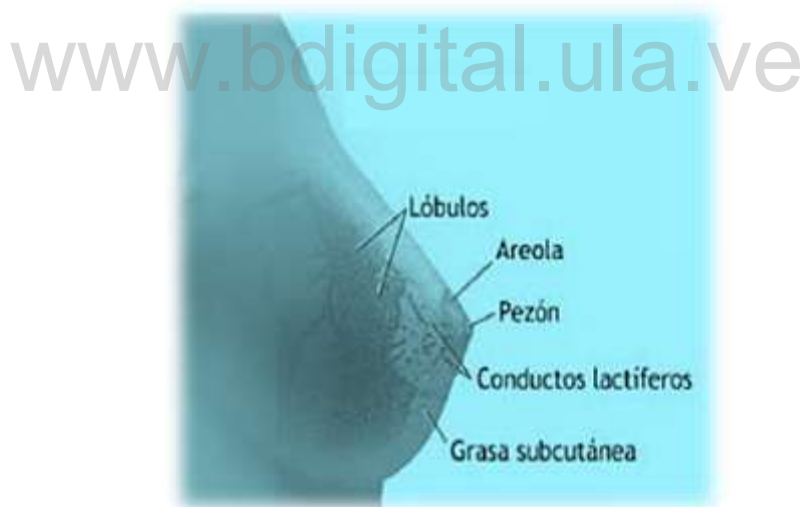


Figura 1. Glándula Mamaria

Fuente: Tapia (2007)

Latarjet y Ruiz (2004) comentaron que la estructura y función de las glándulas mamarias es distinta según el momento del desarrollo en que se encuentren y depende del balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Al respecto, Guyton y Hall (2006) expresan

que las mamas comienzan a desarrollarse en la pubertad estimuladas por los estrógenos producidos en los ovarios, que inician su crecimiento, además de favorecer en ellas el depósito de grasas, que aumenta su volumen. Así mismo, durante el embarazo se produce un crecimiento mucho mayor y sólo entonces, el tejido glandular queda preparado y desarrollado por completo interviniendo con ello, en la lactancia al producir leche. Este fluido es un líquido opaco, blanquecino, compuesto por carbohidratos (lactosa), alrededor de 10% de proteínas (lactoalbúmina, caseína, IgA secretora, lactoferrina y lisozima) y 30% de lípidos, así como zinc, yodo y flúor, sodio, calcio, fósforo, cloro y potasio. La leche materna también contiene enzimas, oligoelementos, factor de crecimiento, vitaminas, mucinas y aminoácidos libres (Mayans y Martell, 1999).

Según lo anterior, puede sintetizarse diciendo que existe una estrecha relación entre el desarrollo de estas glándulas y el ciclo menstrual, porque están sometidas a un proceso dinámico, el cual se inicia en el embrión y culmina con el ejercicio de la lactancia. Sus tejidos son estrechamente sensibles a los cambios hormonales y es así como hay una dependencia de su funcionamiento a la acción de los estrógenos, la progesterona y probablemente también a la acción de la prolactina, la hormona del crecimiento, la insulina y el cortisol (Duque y Rubio, 2006).

De igual manera, Bajo y cols (2009) consideran que la mama presenta tres fases de desarrollo diferenciadas, influenciadas por los niveles circulantes de las hormonas ováricas y sus efectos en los ductos, lobulillos y estroma. La fase del desarrollo se produciría hasta los 20 años, entre los 20 y los 40 años existirá una fase de actividad cíclica lobulillar. Después de los 40 años comenzaría su involución.

Así pues, la mujer puede sufrir cambios en sus glándulas mamarias a lo largo de su vida, bien sea porque las nota más grandes e hinchadas, dolorosas, o se palpan uno o varios nódulos al realizar el auto examen mamario, u observan que tienen secreción por el pezón. Estos hallazgos

le producen temor y ansiedad porque los relacionan con el cáncer. (Bajo y cols., 2009)

Además, Botella y Clavero (1993) sostienen que clínicamente, las lesiones mamarias pueden clasificarse en benignas y malignas. Aunque estas últimas son las que más preocupan, las patologías benignas tienen gran importancia porque forman parte de un gran número de consultas y de su correcto tratamiento depende la profilaxis de las malignas.

Al respecto, la mayoría de las patologías benignas se desarrollan a partir de alteraciones del proceso fisiológico evolutivo normal de la mama, considerándose aberraciones normales de su desarrollo e involución. Entre las lesiones benignas más comunes se encuentran: displasia, mastalgia, secreción por el pezón, fibroadenomas, asimetrías y quistes, entre otros (Soto, 2006). Por otra parte, la hipertrofia de la adolescencia se presenta en la fase de desarrollo, mientras que la mastalgia y los fibroadenomas aparecerían como un desequilibrio hormonal en la fase cíclica y los quistes, las lesiones esclerosantes - fibróticas y la ectasia ductal- se encontrarían durante la etapa de involución hasta la menopausia(Bajo y cols., 2009).

La **enfermedad quística palpable de la mama (EQPM)**, de carácter benigno es una dilatación exagerada de conductos y alveolos galactóforos, que se encapsulan y se llenan de líquido, el cual varía sustancialmente de aspecto; algunas veces es claro, otras lechoso o cremoso y en ocasiones aparece con una coloración pardo-amarillenta, lo que podría indicar la presencia de sangre (Jiménez y cols., 1985).

Así pues, cuando se habla de quistes se está incluyendo un número amplio de tumoraciones benignas de contenido líquido o pastoso, no inflamatorio, que poseen una pared de estructura bien definida y son de naturaleza y origen diversos (Ogalla y cols., 2002).

Según Bajo y cols. (2009), hasta el 7% de las mujeres presenta quistes palpables denominados macroquistes. Típicamente aparecen entre los 35 y 50 años; pueden ser dolorosos si presentan un crecimiento rápido debido a la tensión del líquido que contienen en su interior. Así

mismo, se los divide según las características del líquido en apocrínos y no apocrínos.

De igual forma, se resalta que los quistes mamarios son mamográficamente indistinguibles de los tumores benignos, siendo la ecografía la técnica fundamental para su caracterización y manejo. En todo quiste complejo (con ecos en su interior) debe descartarse cualquier alteración del grosor de la pared del quiste que pudiera indicar la presencia de patología asociada (quiste habitado). Además, los quistes no palpables o indoloros, no necesitan controles periódicos ni intervención diagnóstica alguna. Sin embargo, los quistes voluminosos o dolorosos deberían aspirarse en su totalidad y analizar su celularidad, sobre todo si el líquido es hemorrágico. Si persiste una masa palpable después de la aspiración del líquido del quiste, se deberían realizar nuevas pruebas de imagen y biopsia de la lesión palpable. Una vez demostrada su benignidad, se pueden realizar aspiraciones repetidas. Aunque existe cierta controversia, se admite que existe predisposición de desarrollar patología maligna en las mujeres con múltiples quistes, recomendándose una mamografía/ecografía y exploración clínica anual. (Bajo y cols., 2009)

Por otra parte, González y Márquez (2011), exponen que en la evolución quística, en la etapa apocrina temprana, tanto las células mioepiteliales como el epitelio apocrino hipertrófico/hiperplásico, sufren lisis y liberación de compuestos bioactivos, proteolíticamente activados dentro del fluido de los quistes (quistes secretores tipo I). Por otra parte, la etapa final, antes de la desaparición fibrótica, se caracteriza porque los quistes contienen un líquido de composición similar a la del plasma (quistes transudativos tipo II). Así mismo, se agrega que cuando los quistes presentan una composición bioquímica intermedia, se trata de un estado de transición entre los tipos quísticos.

En este mismo orden de ideas, Arias y cols. (2000) sostienen que en los quistes se diferencia un estadio inicial en el que son más activos, quistes tipo I o secretores, cuyo contenido revela una relación elevada de potasio y sodio (K^+/Na^+) semejante a la del medio intracelular y un estadio

final o quistes tipo II, en los que la relación K^+/Na^+ disminuye, semejándose a la del plasma.

Los quistes tipo I están revestidos por epitelio tipo apocrino que puede dar lugar a proyecciones luminare papilares, en tanto que los tipo II les reviste epitelio plano con mínimos cambios apocrinos. Estas características histológicas se correlacionan con diferencias hormonales y metabólicas, en la naturaleza del fluido quístico que son relevantes (Arias y cols., 2000).

Según Uriburu (1977), normalmente la causa más común de los quistes mamarios son los cambios hormonales de la mujer. Estos pueden darse en la adolescencia o en la menopausia, pero se relacionan más frecuentemente con el ciclo de menstruación, porque se produce un influjo hormonal en ese momento, debido a que la glándula mamaria es un órgano endocrino que responde sensiblemente a los niveles de estrógenos y progesterona circulantes, pudiendo estimularse la proliferación del epitelio mamario y causando dilatación de los conductos, con formación subsecuente de quistes. De romperse este equilibrio y existir un dominio estrogénico sin contraposición de la progesterona, puede ocasionar hiperplasia y atipias (cambios anormales en las células), lo que podría conllevar en algunos y ciertos casos a desarrollar cáncer de mama, siempre y cuando se conjugue con otros factores.

Cabe resaltar que la enfermedad quística palpable de la mama ha sido una fuente de preocupación clínica por dos grandes razones: (a) dolor e incomodidad; (b) se asemejan a masas malignas, incrementando la inquietud por falsos positivos en imagenología y procedimientos diagnósticos invasivos no justificados (Mannello, 2006).

En tal sentido, el estudio de esta patología requiere tener un basamento general sobre las macromoléculas que conforman a los seres vivos, para luego especificar todo lo referente a las proteínas, su jerarquía estructural, sus funciones, sus tipos y los métodos de separación y cuantificación, así como estudios que engloben lo anterior, conjuntamente con la determinación de los fluidos de quistes de mamas para enriquecer

los conocimientos que deben manejar los profesionales de la medicina, entre ellos los ginecólogos, al momento de realizar los controles tradicionales a sus pacientes, pudiendo dar diagnósticos acertados. Por ello, seguidamente se hace mención a tales fundamentos teóricos.

En tal sentido, Melo y Cuamatzi (2004) expresan que las moléculas que forman las estructuras y ejecutan las actividades de las células son moléculas grandes, altamente organizadas llamadas macromoléculas. Estas se pueden dividir en 4 categorías principales: ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Los primeros 3 son polímeros compuestos de gran número de elementos de bajo peso molecular o monómeros. Estas macromoléculas se construyen a partir de monómeros mediante un proceso de acoplamiento que les confiere sus características y funciones. La estructura básica y función de cada familia de moléculas grandes es muy similar en todos los organismos desde las bacterias hasta el ser humano.

De acuerdo con Peña (1988), los ácidos nucleicos son moléculas esenciales para las funciones de las células, en la cual existen dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). En el ADN se localiza la información genética de la célula, mientras que diferentes moléculas de ARN forman parte del sistema que traduce esta información en las proteínas que determinan la estructura y función celular.

Al respecto, **las proteínas** son polímeros formados por 20 tipos de α -aminoácidos los cuales tienen una función fundamental en casi todos los procesos biológicos (Fig. 2). La mayoría de las enzimas que son los catalizadores de las reacciones bioquímicas, son proteínas. Se ha estimado que el cuerpo humano tiene alrededor de 100.000 tipos de proteínas, cada una de las cuales tiene una función específica (Chang y College, 2002; Murray y Kobayashi, 1997). El tipo y número de aminoácidos, junto con la secuencia u orden en el que estos se alinean, determinan la estructura molecular de las proteínas. (Chang y Collage, 2002).

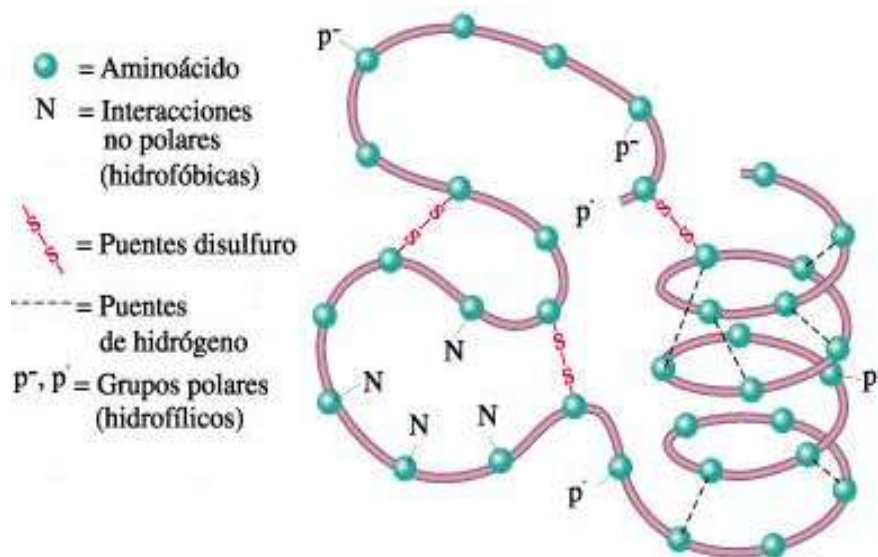


Figura 2. Estructura molecular de una Proteína

Fuente: Solomon (2008)

En esta misma línea conceptual, cabe señalar que la **jerarquía estructural de las proteínas** suele dividirse en cuatro niveles de organización. Como puede apreciarse en la figura 3, la **estructura primaria** se refiere a la secuencia única de aminoácidos de la cadena polipeptídica; la **estructura secundaria** toma en cuenta aquellas partes de la cadena de polipéptidos que poseen una disposición espacial regular, la cual se estabiliza por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo (CO) y amino (NH) del esqueleto, por ejemplo, la hélice α y la hoja β plegada; la **estructura terciaria** se aplica a la forma como la estructura secundaria se enrolla sobre la misma, estructura tridimensional estabilizada por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y otras fuerzas intermoleculares. Por último, la unión de cadenas de polipéptidos independientes para formar una proteína activa constituye la **estructura cuaternaria**. Por ejemplo, la molécula de hemoglobina está formada por cuatro cadenas polipeptídicas separadas, o subunidades que se mantienen unidas por fuerzas de van der Waals, fuerzas iónicas y puentes de hidrógeno (Chang y College, 2002).

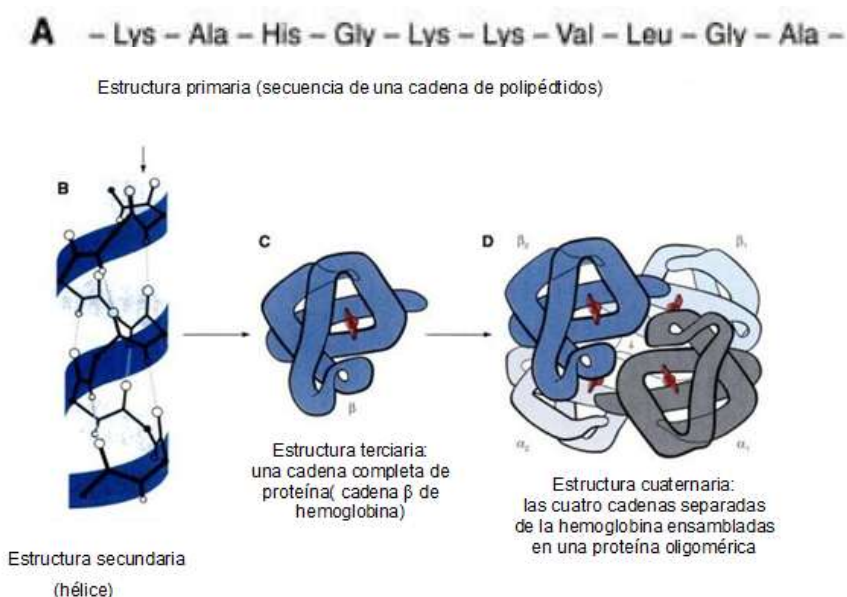


Figura 3. Jerarquía estructural de las proteínas

Fuente: Voet y Voet (2006)

Por otra parte, como ya se había reseñado, las proteínas son los efectores de numerosos procesos celulares y tienen funciones específicas, tales como transporte y almacenamiento de sustancias vitales, el movimiento coordinado, el soporte mecánico y la protección contra enfermedades. (Murray y Kobayashi, 1997).

En cuanto a la degradación de proteínas, es importante hablar sobre las proteasas, las cuales son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos, catabolizando así las proteínas hasta cuantificarlas en oligopéptidos y aminoácidos.

Tales enzimas, pueden ser clasificadas en base al mecanismo catalítico que poseen, en: endoproteasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos y exoproteasas, las cuales actúan hidrolizando enlaces peptídicos ubicados en los extremos de los polipéptidos. Dichos mecanismos son evidenciados cuando la actividad enzimática se inhibe por medio del uso de compuestos que alteran los residuos del sitio activo

característicos de los que depende cada tipo de catálisis, o por medio del uso de compuestos que secuestran los cofactores. (Rosales, 2004)

Recientemente, las enzimas proteolíticas, han adquirido un gran interés en fisiopatología tumoral debido a que se ha reportado su presencia en tumores, porque se cree que participan en la degradación de los componentes principales de la matriz extracelular y membrana basal facilitando, de esa forma, la invasión tumoral y las metástasis. (Vizoso y cols., 2000)

Así mismo, las enzimas proteolíticas que son expresadas por los carcinomas humanos se agrupan en cuatro grandes familias: metaloproteinasas, aspartil-proteinasas, cisteín-proteinasas y serín-proteinasas. La expresión tumoral de la mayoría de estas proteínas ha sido asociada con un comportamiento más agresivo de los carcinomas humanos. Sin embargo, su expresión tumoral no siempre implica un pronóstico adverso, ya que enzimas como el activador tisular del plasminógeno, el antígeno prostático específico y el pepsinógeno C, han sido asociadas con un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama. Además, existen datos que sugieren que estas expresiones tumorales pueden estar relacionadas con una vía específica de respuesta hormonal, lo que resulta demostrativo del complejo papel que pueden desempeñar las enzimas proteolíticas en la fisiopatología tumoral. (Vizoso y cols., 2000)

Por otra parte, el resultado final de la acción de las enzimas proteolíticas dependerá en gran medida del balance con sus inhibidores naturales, producidos por las propias células tumorales para coordinar su acción invasiva, o bien por las células estromales como mecanismo de defensa ante la progresión tumoral. Finalmente, existen datos que indican que la utilización de inhibidores sintéticos de las enzimas proteolíticas puede representar una nueva y prometedora alternativa terapéutica para los carcinomas humanos. (Vizoso y cols., 2000)

A continuación se hace mención a los cuatro grupos de enzimas proteolíticas nombradas anteriormente.

Las **metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)** están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos e intervienen en la rotura de la matriz extracelular (ECM)(del inglés extracelullar mathrix). Las MMP constituyen una familia de endopeptidasas neutras dependientes de zinc, capaces de degradar los componentes esenciales de la matriz. Los inhibidores tisulares endógenos de las MMP (TIMP), reducen la degradación proteolítica excesiva de la ECM (Cascales y Álvarez, 2009). Además, participan en todos aquellos procesos fisiológicos y patológicos, que implican remodelación tisular, incluyendo el desarrollo embrionario, morfogénesis tisular, crecimiento óseo, cicatrización de heridas, enfermedades inflamatorias y cáncer. Los estudios realizados en los últimos años han hecho que las familias de las MMP haya crecido de manera considerable y hasta el momento se han descrito 25 miembros que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelisinases, metaloproteinasas de membrana (MT-MMP) y otras MMP. Todas ellas difieren en algunas características estructurales y en su especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación de prácticamente la totalidad de los componentes macromoleculares de la matriz extracelular. (Boticario y Cascales, 2008). Según Stryer y cols. (2002), las **Aspartil-proteinasas** también conocidas como ácido proteasas, son una familia de enzimas endonucleasas que se caracterizan por tener muy conservada la secuencia Asp-Gly-Thr. Además, Vizoso y cols. (2000) agregan que entre estas se encuentra la catepsina D (cat-D), que es una proteasa ácida lisosomal presente en todas las células a bajas concentraciones, y el pepsinógeno C (pep-C), que es una enzima proteolítica normalmente involucrada en la digestión de proteínas en el estómago y en la proteólisis del líquido seminal en la vagina.

De igual forma, hay un grupo de proteinasas que contienen serina en el centro activo, es decir las **Serin-proteinasas**. Entre ellas figuran las enzimas proteolíticas tripsina, quimiotripsina y elastasa, que participan en

la digestión y la enzima fibrinolítica plasmina y sus activadores. Al respecto, estas sustancias convierten el plasminógeno en plasmina y desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación. El sistema de la activación del plasminógeno es, además, un complejo sistema de cascada proteolítica que, junto a otros sistemas enzimáticos, participa en la degradación de la matriz extracelular durante los procesos de reparación tisular en condiciones normales y patológicas, incluyendo la invasión cancerosa. (Vizoso y col, 2000)

La familia de las **Cisteín-proteinasas**, engloba a todas aquellas proteasas que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico y entre ellas, las caspasas y las calpaínas desempeñan un papel importante en los procesos apoptóticos en el sistema nervioso (Jordán, Galindo, Calvo, González y Cena, 2000).

Así mismo, este grupo de enzimas proteolíticas lisosomales intervienen muchas fases celulares normales, especialmente en el recambio tisular. Además, parecen estar involucradas en determinados procesos patológicos benignos, así como en la invasión cancerosa y las metástasis. Hasta el momento, se han aislado y caracterizado 10 Cisteín-proteinasas lisosomales humanas: catepsinas B, L, H, S, O, K, C, W, L2 y Z. Todas ellas contienen un residuo de cisteína en el centro activo de la molécula y, en prácticamente todos los casos, se sintetizan como proenzimas que deben ser activadas para su actuación, pero difieren en algunas características enzimáticas, incluyendo su especificidad de sustrato y su estabilidad en función del pH. Además, estas proteinasas pueden ser producidas por las propias células tumorales o inducidas en las células del estroma tumoral en el contexto de una relación dinámica entre ambos tipos celulares, que parece adquirir cada vez mayor auge en la comprensión de la fisiopatología tumoral. De cualquier forma, la expresión tumoral de muchas enzimas proteolíticas parece aportar información pronóstica útil en pacientes afectados de diversos tipos de neoplasias. En este sentido, los estudios sobre las diferentes proteasas, así como de sus inhibidores, pueden aportar una mayor precisión sobre el

comportamiento biológico y clínico de los diferentes tumores. (Vizoso y col, 2000)

Conjuntamente con lo expresado antes los métodos de separación y cuantificación de proteínas son de suma importancia en el ámbito investigativo. Una de sus aplicaciones consiste en el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Para ello, las proteínas deben separarse selectivamente a partir de muestras complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado el cual se basa en diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga, entre otras. (Cooper, 1984).

Una de las técnicas de separación más utilizada es la **electroforesis**, la cual se fundamenta en la capacidad migratoria de las moléculas cargadas cuando se les coloca en un campo eléctrico, empleando un soporte de separación, entre otras la poliacrilamida, a través de la cual pueden migrar individualmente las proteínas. Este método es muy valioso para conocer la diversidad de tipos de proteínas presentes en una solución, puesto que es muy difícil que dos proteínas contenidas en una mezcla posean combinaciones de carga y tamaño que causen una migración de manera semejante (Maldonado y cols, 2008).

La electroforesis en gel emplea, la acrilamida o agarosa como medio semisólido de soporte (Fig. 4), el cual permite que las moléculas migren de manera homogénea, oponiéndose al movimiento aleatorio molecular (movimiento Browniano) debido a que éstas poseen energía cinética propia (Bollag y Cols., 1996). El gel se constituye de un polímero soluble de muy alto peso molecular, que atrapa las moléculas de agua y forma un tamiz molecular, que dificulta el movimiento de las proteínas y como consecuencia, la migración electroforética de las moléculas es más lenta. Si se aumenta la intensidad del campo eléctrico, puede acelerarse la migración molecular, por lo tanto el frente de migración avanzará en forma compacta. Así, puede mejorarse la definición del frente, aumentando la diferencia de potencial entre los polos, lo cual, estará limitado tan solo a la capacidad de la solución para disipar el calor

generado por el paso de la corriente eléctrica. Esto último, debido a que si el calor se acumula puede hacer que incremente la temperatura en la solución de corrida e incluso descomponer el gel y/o las proteínas. La presencia del gel tiene una consecuencia adicional, ya que aquellas moléculas de mayor tamaño hallarán mayor resistencia al avanzar a través de los poros del gel, que aquellas moléculas pequeñas. Por lo tanto, la fricción que se observa durante el movimiento electroforético en un gel, depende de la masa y la forma de la molécula en adición a su carga eléctrica. Aunque el solvente puede por sí solo producir una fricción diferente sobre diversas moléculas, su efecto es muy poco apreciable cuando no existe el entramado del gel (García, 2000).

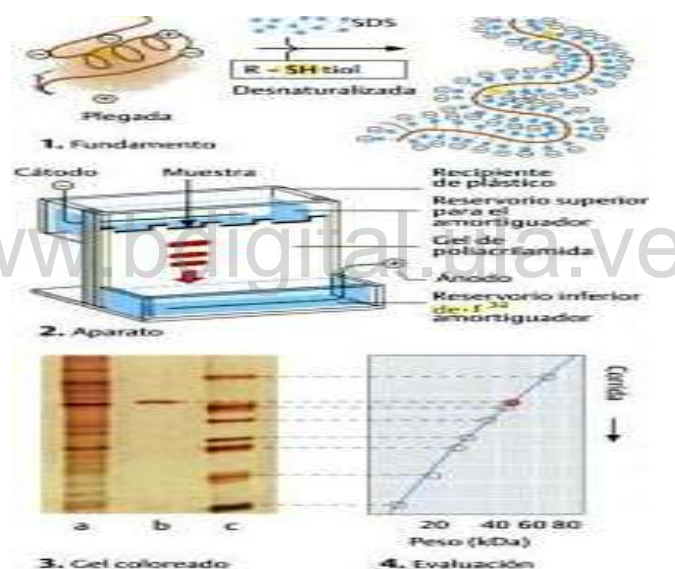


Figura 4. Electroforesis en gel poliacrilamida

Fuente: Koolman y Heinrich (2004)

Uno de los procesos electroforéticos más comúnmente usados para la caracterización de proteínas es la **Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)** (del inglés Sodium Dodecil Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Fig. 5), en el cual se emplea Dodecil Sulfato Sódico ó SDS como detergente aniónico, que permite romper los enlaces no covalentes entre las proteínas (desnaturalización) y aportar una fuerte carga eléctrica negativa a las

proteínas desnaturadas. La carga original de la molécula queda completamente enmascarada por la carga negativa del SDS, debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además la forma molecular de las proteínas acomplejadas con el SDS, es fija. (Cooper, 1984).

Además del SDS, se emplea otro agente desnaturante, un agente reductor, generalmente el 2 β - mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys- S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH). Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria de las proteínas, se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel (Cooper, 1984)

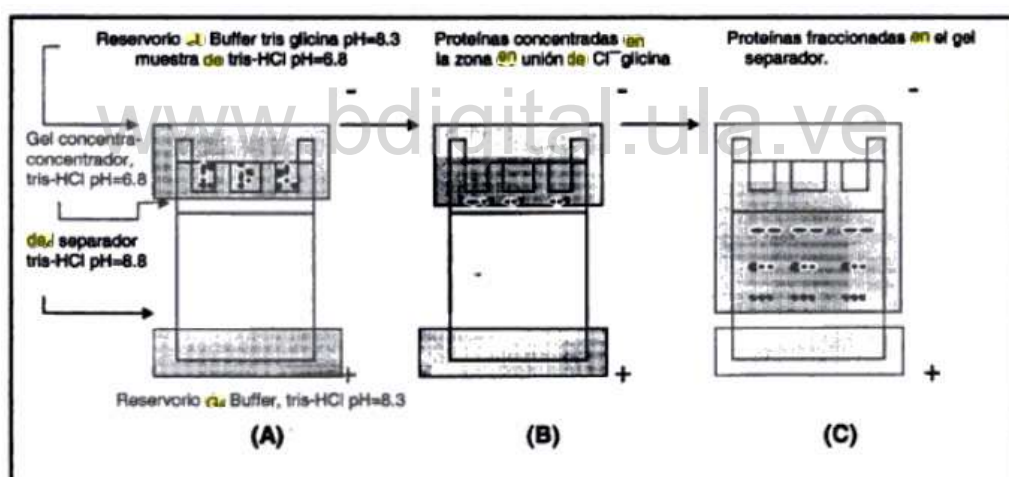


Figura 5. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Fuente: Zavala (2005)

Con respecto a los métodos de cuantificación de proteínas, **la determinación de la concentración proteica por espectrofotometría de absorción a 280/260nm**, es una técnica rápida que permite estimar la concentración de proteínas en una muestra problema y los niveles de contaminación con ácidos nucleicos. Se fundamenta en la cantidad de radiación absorbida, ya que cada sustancia absorbe más luz en un valor

específico denominado longitud de onda analítica. En las proteínas, la longitud de onda analítica es de 280nm, que corresponde con la longitud de onda de absorción por los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, en el ADN/ARN se refiere a la absorción a 260nm de las bases nitrogenadas. (Bollag y col, 1996) (Tabla de Warburg y Christian, 1941- Ver anexo B)

Luego de haber citado las técnicas de separación y cuantificación de proteínas y sus procedimientos, es necesario exponer algunos estudios relacionados con dichos métodos, así como con la composición proteica de los líquidos ó fluidos contenidos en los quistes mamarios.

2. ANTECEDENTES

La detección de proteasas y sus inhibidores ha sido motivo de investigaciones previas en la sección de biotecnología del IDFFB – ULA y otros grupos de esta universidad:

Fuenmayor (2000), desarrolló una investigación, donde examinó el papel estructural y funcional de la actividad Ca-Proteína en el estadio epimastigote de *Trypanosoma cruzi* y su relación con la presencia de actividad enzimática Cisteíno Proteasa. A través de la electroforesis desnaturizante en placas verticales detectaron en *Trypanosoma cruzi* la banda de peso molecular promedio de 22 KDa de la Ca- Proteína. Por otra parte, la actividad de la Cisteino-Proteasa, facilitó la migración electroforética de la actividad Ca-Proteína, donde obtuvieron una correlación positiva entre la actividad específica Cisteíno-Proteasa y la migración electroforética de la Ca-proteína.

Torres y Zambrano (2001), aplicaron la técnica de difusión radial en caseína, tomando como muestra los venenos de serpientes, escorpiones, suero de *Didelphismarsupialis* y suero humano, para poder evaluar la actividad Cisteíno-Proteasa, y buscando la presencia de activadores e inhibidores de la proteasa del *T.cruzi*. Demostraron que todos los venenos tienen moduladores de la actividad Cisteíno-proteasa. Además, en dicho

estudio encontraron una proteasa de 65 KDa, la enzima de 52 KDa y la Cisteíno proteasa de 40 KDa. Afirmó que las proteasas van a contribuir a la degradación de las proteínas, sirviéndole al parásito como medio para obtener su alimento.

En el año 2001, Roa realizó un trabajo cuyos resultados se basaron en los ensayos de la actividad biológica Cisteino-Proteasa de las fracciones obtenidas del fruto de *Bromelia chrysantha* Jacq. En síntesis, el método empleado se llevó a cabo en placas de agarosa al 0.8 % en buffer Barbital, conteniendo caseína (leche Karla 1%); las muestras fueron colocadas en pozos, en presencia de amortiguador de carga (Laemmli). Se dejaron difundir en cámara húmeda a 37 °C y fueron observados a intervalos de 30 minutos, por cuatro horas. Los resultados positivos se evidencian como halos transparentes, blanquecinos y algunos opacos ubicados en torno a los pozos. Algunas fracciones se usaron en conjunto con el fin de evidenciar un efecto estimulatorio o inhibitorio de las Cisteino Proteasas.

Por su parte, Rosales (2004) llevó a cabo una investigación en el tracto digestivo y excreta del insecto transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*, por medio de placas de agarosa, con la finalidad de determinar y caracterizar proteasas susceptibles a SDS, así como el tipo de mecanismo catalítico. Por otra parte, realizaron electroforesis SDS-PAGE, hallando los pesos moleculares de dichas enzimas, al igual que el efecto del agente reductor β -mercaptoetanol. Hallaron tres proteasas en las glándulas salivales y ocho en el segmento estómago-intestino-recto, cuyas actividades varían con el tiempo de ayuno del insecto. La proteasa mejor caracterizada, es una serin proteasa de 252 KDa., presente en pequeñas cantidades en la parte baja del tracto digestivo. Posee la mayor actividad y frecuencia entre las proteasas del segmento estómago-intestino-recto, máximo de actividad a los siete días de ayuno del intestino y posiblemente sea inhibida por un compuesto presente en el tracto digestivo.

No cabe duda del papel complejo de las enzimas proteolíticas en la biología de los tumores humanos, ya que no sólo parecen estar involucradas en la degradación de la membrana basal y matriz extracelular, así como en otros mecanismos que propician la progresión tumoral, sino que también, en algunos casos, su expresión se relaciona con una menor agresividad tumoral, presumiblemente enmarcada en el ámbito de una vía específica de respuesta hormonal. (Vizoso y col, 2000)

Con relación a esta línea de investigación, Haagensen (1971) investigó el efecto de los estrógenos en ratones, encontrando que, dicha hormona no solo estimula la proliferación del epitelio mamario, sino que también ocasiona dilatación de los conductos mamarios y formación de quistes. En base a esto, realizó un estudio bioquímico en el cual empleó hormonas marcadas radiactivamente para evaluar proteínas de unión a éstas, en fluido de quistes de mama y en suero de sangre humana, obteniendo como resultado, que el fluido de quistes de mama tiene una alta afinidad por la progesterona y la pregnelona, a diferencia del suero humano donde la afinidad es mucho más baja.

Posteriormente, Boccado y col. (1988), analizaron el fluido de quistes de mama obtenido por técnica de punción aspiración con aguja fina (PAAF) en 86 mujeres. El estudio consistió en medir los niveles de sodio (Na^+), potasio (K^+), dehidroepiandrosterona- sulfato (DHEA-S) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los resultados obtenidos arrojaron que estos niveles participan en el control autocrino y paracrino del crecimiento de células cancerígenas en la mama.

Estudios realizados por Sánchez y colaboradores, en el año 1997 determinaron la presencia de Zn- α 2-glicoproteína (ZAG) en el fluido de quistes mamarios, una proteína soluble, aislada inicialmente en plasma humano, que presenta similitud con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (CMH-I) que posee un peso molecular de 39 KDa, evaluado por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); su función se desconoce, aunque varios estudios han demostrado su presencia en otros fluidos corporales, incluyendo el sudor,

líquido seminal, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, leche materna y orina. Además, ZAG se encuentra en altas concentraciones en el fluido de quistes de mama y en un 40% en carcinoma mamario. Estos hallazgos, más el hecho de que ZAG es inducida por andrógenos y glucocorticoides, sugiere que esta proteína participa en el desarrollo de enfermedades mamarias incluyendo, cáncer de mama.

En esta misma línea de investigación, González y Márquez (2011), evaluaron el contenido proteico del fluido de quiste de mama, en mujeres de edades comprendidas entre 39 y 46 años. La evaluación electroforética de estas muestras mostró un total de 10 bandas proteicas con los siguientes valores de peso molecular: 13.8; 15.6; 22; 34.4; 40.2; 54.4; 66.1; 70.4; 91.1 y 94.6KDa. Los pesos moleculares de 40.2 y 66.1 KDa. fueron comparados con la bibliografía consultada y corresponden a la Zn- α_2 -glicoproteína y la seroalbumina. En esta investigación se empleó el método de Ferguson Plot, dando como resultado que ambas proteínas (Zn- α_2 -glicoproteína y la seroalbumina) poseen una densidad de carga similar con pesos moleculares diferentes. Los valores de concentración de proteínas encontrados, indican una baja variabilidad entre las diferentes muestras que oscila entre 12 y 16 mg/ml. Estas autoras sugieren, que en el fluido de los quistes podría existir una cisteino-proteasa. Los resultados obtenidos de la evaluación electroforética mostraron perfiles proteicos similares para las diferentes muestras, pudiendo este método ser utilizado como una herramienta efectiva para la estimación de los pesos moleculares y la densidad de carga de las proteínas encontradas en el fluido de quiste de mama.

Cabe resaltar la importancia del estudio del fluido de los quistes mamarios, ya que se logra caracterizar proteínas asociadas al cáncer de mama, aislándolos a partir de fluidos de secreción, como por ejemplo lo es la Zn- α_2 -glicoproteína, la proteína más predominante en dichos quistes.

Además, un estudio realizado por De la Vega y cols (2001) expone que la GCDFFP-24 (de sus siglas en inglés grosscysticdisease fluid protein), es la proteína más abundante en los quistes mamarios y que

puede corresponder a la Apo- proteína D, la cual es una glicoproteína relacionada con el transporte de lípidos en sangre.

En el año 2002 Maeda y colaboradores, estudiaron el fluido de quistes de mama, encontrando altas concentraciones de dehidroepiandrosteronasulfato(DHEA-S) y sulfato de pregnenolona (PREGS), especialmente en aquellos quistes con elevado contenido de K^+ y bajas concentraciones de Na^+ . Además, observaron niveles mayores de DHEA-S en quistes con epitelio apocrino que en aquellos formados por epitelio plano.

De igual manera, Tsung y cols. (2005), realizaron un estudio bioquímico y citológico del fluido de quistes de mama, en el cual determinaron la composición bioquímica del fluido de 52 quistes y los clasificaron en tipo I y II, en base a la relación sodio/potasio (Na^+/K^+) en el fluido, encontrando que dichas concentraciones diferían en múltiples quistes de los mismos individuos.

Además de las investigaciones anteriores, Celis y cols. (2008), en un estudio realizado al fluido de quiste de mama, demostraron la presencia de proteasas (kalicreína 6 y pepsinógeno C), c-ErbB-2 oncoproteína (ErbB-2 proteína) y antígeno carcinoembrionario. Así mismo, determinaron la presencia de Zn- α 2-glicoproteína, apolipoproteína D (apoD), también conocida como la proteína de la enfermedad quística palpable de la mama 15 y 24 (GCDFP-24 y GCDFP-15) dado que estas, junto a ZAG son las proteínas más abundantes en el fluido de quistes de mama.

El estudio anterior permitió a Celis y cols. (2008), sugerir que un estudio bioquímico realizado al fluido de quiste mamario, contribuiría a la identificación acertada de proteínas diferenciales expresadas que lo caracterizarían específicamente, información que podría usarse en la prevención temprana de lesiones de tipo maligno, abriendo una ventana de oportunidades para el diseño de pruebas de laboratorio diagnósticas.

Para el año 2009, Riza y cols. estudiaron el fluido de quistes de mama estableciendo al igual que otros autores 2 tipos de quiste (tipo I y

II); encontrando que los quistes tipo I, tienen concentraciones más altas de K^+ , concentraciones bajas de Na^+ y Cl^- , concentraciones más altas de andrógenos, estrógenos y EGF; mientras que los quistes tipo II tienen concentraciones más altas de Na^+ y Cl^- , así como concentraciones inferiores de K^+ , hormonas sexuales y EGF.

La temática planteada presenta diferentes puntos de vista. Numerosos investigadores afirman que la presencia de quistes de mama no aumenta el riesgo de padecer cáncer en este órgano, sin embargo, otros investigadores afirman que si hay un aumento de riesgo de padecerlo. La profundización de los estudios de esta condición quística ha demostrado que, en las mujeres de la cuarta década de la vida, el tejido mamario puede sufrir hipertrofia, asociada con un incremento del tejido estromal y a una elevada prevalencia de formar quistes clínicamente palpables, ocasionando un incremento en el riesgo de cáncer.(Riza y col, 2009).

De acuerdo con Muñoz (2002), el estudio de la composición proteica en fluidos de quistes de mama constituye una fuente importante de información, ya que, la proporción de las fracciones proteicas individuales cambia en el transcurso de un gran número de enfermedades lo que conlleva que, la cuantificación de las mismas sea de valor considerable en el diagnóstico clínico. Por ello, es indispensable conocer los elementos constituyentes de los fluidos quísticos y así contribuir en el establecimiento de un patrón, que permita diagnosticar y reconocer la evolución de dicha enfermedad quística mamaria.

Hasta ahora, se han caracterizado proteínas asociadas al cáncer de mama, aislándolas a partir de fluidos de secreción. Así, se identificaron las proteínas mayoritarias de los quistes de mama, que resultaron ser albumina, Zn- α 2-glicoproteína, apolipoproteína d y p-15. También se clasificaron las secreciones mamarias en dos tipos, con distintas proteínas. Los polipéptidos característicos de las secreciones tipo I son Zn- α 2-glicoproteína, apolipoproteína d y p-15; mientras que los de las secreciones tipo II son lactoferrina, lisozima y α -lactalbumina. Además, se

ha demostrado que la presencia de secreciones tipo II está significativamente asociada al cáncer de mama. Así mismo, el estudio de las proteasas de quistes y secreciones, permitió detectar la presencia de Catepsina D en ambos tipos de fluidos y establecer que la concentración de esta proteinasa es significativamente más elevada en las secreciones de pacientes con carcinomas que en las de mujeres sin cáncer. Por otra parte, se ha demostrado que una proteinasa gástrica, el pepsinógeno C se produce y acumula en los quistes de mama y en el 30% de los carcinomas mamarios (Gallego, 2004).

Ya que las enfermedades benignas de la mama afectan a poco más de la mitad de las mujeres, aunque muy pocas de ellas pueden considerarse lesiones premalignas o malignas (Soto, 2006), tales patologías deben ser estudiadas cuidadosamente, pues la exploración clínica junto a las técnicas de imagen muchas veces no son concluyentes, requiriendo la evaluación histopatológica de las lesiones para descartar un proceso de malignidad con seguridad. La gran mayoría de los estudios consideran la patología benigna mamaria como un factor de riesgo importante de mama, por lo cual su relación es crucial para el manejo clínico posterior de la mujer (Bajo y cols., 2009).

En tal sentido, es importante conocer la composición de los quistes mamarios, al igual que su inocuidad. Esto dará mayor información al ginecólogo para el tratamiento a aplicar. Por tal razón, se propuso realizar una investigación experimental en torno a una afirmación referida a los quistes de mama y su perfil proteico. La misma se presenta a continuación.

3. HIPÓTESIS

En los fluidos de quistes de mama existen proteínas con actividad proteasa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- ✓ Evaluar el perfil proteico y la actividad específica proteasa en fluidos de quistes de mama a través de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, espectrofotometría y actividad específica proteasa.

4.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar el contenido proteico del fluido de quistes de mama mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.
- ✓ Cuantificar la concentración de las proteínas totales empleando la técnica de espectrofotometría.
- ✓ Determinar la actividad específica proteasa en las proteínas presentes en los quistes de mama a través de placas de agarosa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se tomaron en cuenta tanto los sujetos objeto de estudio como la metodología empleada y los equipos requeridos en cada uno de los procedimientos. Esto puede resumirse así:

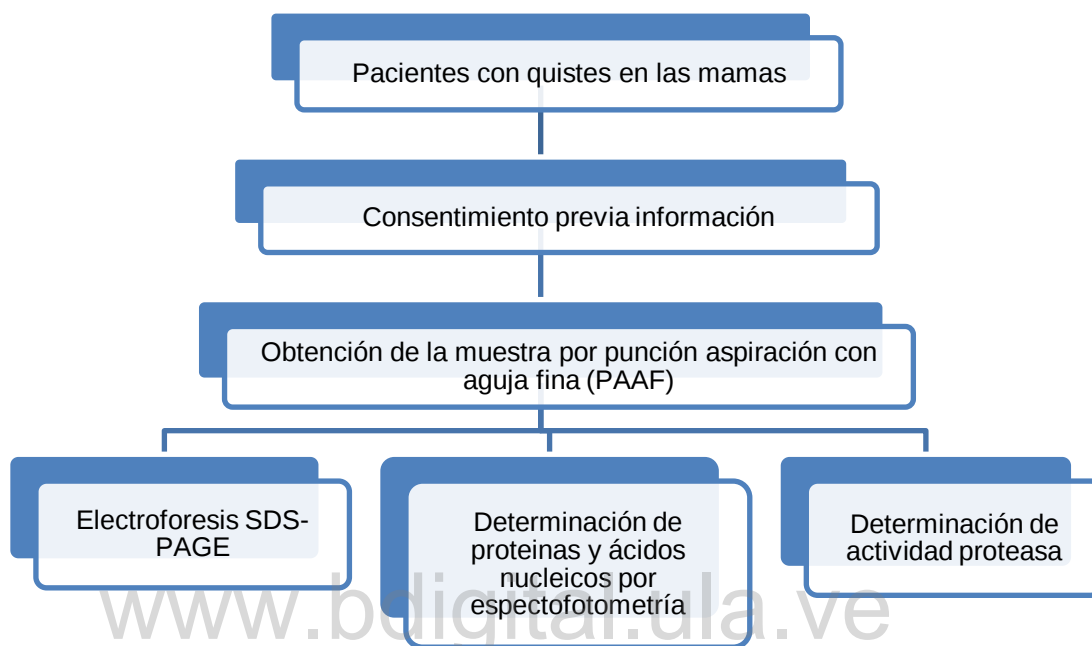


Figura 6. Esquema general de trabajo

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

5.1. Material Biológico

Para desarrollar la parte experimental de esta investigación se estableció contacto con personal médico perteneciente al Seguro social "Juan Montezuma Giannary" de la ciudad Valera-Edo. Trujillo.

Posteriormente se realizó una entrevista breve e informal a cada ginecólogo de estas dos instituciones de salud pública, para darles a conocer el objetivo principal del estudio, dejando sentado que las pacientes debían dar su consentimiento para donar el fluido extraído de su mama y saber que dichas muestras iban a ser empleadas netamente con fines investigativos.

Las muestras estuvieron constituidas por fluidos provenientes de los quistes mamarios de pacientes que asistieron a consulta ginecológica en un centro asistencial de salud pública localizado en territorio venezolano. A saber: Seguro social "Juan Montezuma Giannary" de la ciudad Valera-Edo. Trujillo. Así pues, se obtuvieron doce(12) fluidos de quistes mamarios extraídos a pacientes de sexo femenino en edades comprendidas entre 20 y 50 años de edad, durante los meses de julio, agosto y septiembre del año 2013.

La obtención del fluido contenido en cada quiste de mama muestreado, fue llevada a cabo empleando la **Técnica de punción aspiración con aguja fina (PAAF)**, ya que la mayoría de las pacientes con esta patología son tratadas satisfactoriamente con este procedimiento de fácil aplicación, rápida y prácticamente indolora que no requiere de anestesia. Este método se realiza sobre masas redondeadas, lisas, movibles sospechosas clínicamente o diagnosticadas como quísticas en el ultrasonido, proporcionando resolución permanente del quiste en la mayoría de los casos (Fernández-Cid y López, 1983; Mannello y Cols., 2006).

Dicha técnica fue practicada por el ginecólogo de cada uno de los centros asistenciales antes citados. Este médico especialista procedió a fijar con una mano la zona en la cual se ubicó el quiste, previa asepsia. Seguidamente tomó una jeringa con aguja fina de 23mm x 0.65 o mediante una pistola especial (Cameco), con la cual realizó la punción en el sitio específico. Luego se aspiró la mayor cantidad de líquido posible contenido dentro del quiste. Posteriormente, se retiró totalmente la aguja, teniendo cuidado de no soltar el embolo y tratando de no traumatizar el lugar donde se encontraba el quiste. Inmediatamente se retiró la aguja de la jeringa y en ese extremo se colocó la capucha de la aguja, y se sujetó con una cinta adhesiva, evitando q se cayera para después mantener en refrigeración dichas jeringas (Fig. 7).



Figura 7. Técnica de punción-aspiración con aguja fina (PAAF)

Fuente: Baggish (2009)

Además de lo dicho anteriormente, es importante señalar que el material biológico (fluidos de quistes de mamas), fue procesado con las debidas condiciones de asepsia y antisepsia que requirió el caso, guardando los parámetros que exige la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Ministerio del Poder Popular Para Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

Una vez obtenidas las muestras del fluido de quistes de mama, se realizó su estudio macroscópico después de haber determinado si su volumen era suficiente para proceder con los análisis posteriores. Tal análisis se fundamentó en su aspecto físico y color. Posteriormente y luego de haber desechado cuatro muestras (una procedente de Valera y tres que provenían de Barinas), cada una de las 12 muestras restantes se introdujo en el fondo de tubos Eppendorf estériles, debidamente

rotulados (muestra 1, 2, 3, 4, 12), conservándolas en el refrigerador (-30° C a - 4°C), hasta su posterior evaluación.

5.2. Metodología

5.2.1. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bollag y col., 1996)

La realización de esta técnica usada para identificar proteínas requirió del uso de sustancias existentes en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Las mismas fueron:

- **Stock 1.** Tris-HCl 2M pH 8.8. Mezcla hecha con 24,2 g de Tris base más 50 ml de agua destilada, más HCl hasta ajustar pH a 8.8, más agua destilada c.s.p. 100ml.

- **Stock 2.** Tris -HCl 1M pH 6.8. Mezcla hecha con 12,1 g de Tris base más 50 ml de agua destilada, más HCl hasta ajustar pH de 6,8 más agua destilada c.s.p. 100ml.

- **SDS al 10%.** Mezcla hecha con 10 mL de SDS, más agua destilada c.s.p. 100 mL.

- **Glicerol al 50%.** Mezcla hecha con 50mL de glicerol, más 50mL de agua destilada.

- **Azul de Bromofenol.** Este último reactivo se empleó en este estudio para preparar una dilución al 1%. Esto se hizo mezclando 100 mg de azul de Bromofenol con 0.9 mL de agua destilada.

a.- Para elaborar los geles se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A: 29.2gr de acrilamida, 0.8gr de bisacrilamida y agua destilada c.s.p. 100mL.
- Solución B: 75ml de stock 1, de SDS al 10% 4mL, 21 mL de agua destilada.
- Solución C: 50mL de stock 2, de SDS al 10% 4mL, 46 mL de agua destilada.
- Persulfato de amonio al 10%: 0,1 g de Persulfato de amonio, 0.9 ml de agua destilada.
- TEMED 5 μ L.

www.bdigital.ula.ve

b.- Para realizar la corrida electroforética se preparan las siguientes soluciones tampón

- Buffer de carga: el cual se compone de 3g de Tris base, 14.4g de glicina, 1g de SDS y agua destilada c.s.p 1000mL.
- Buffer 3: Tris base 0.3 mL y pH 8.8, β -mercaptoetanol 0.25 gr, 1mL de SDS al 10 %, 0.5 mL azul de bromofenol y la cantidad restante de agua destilada.

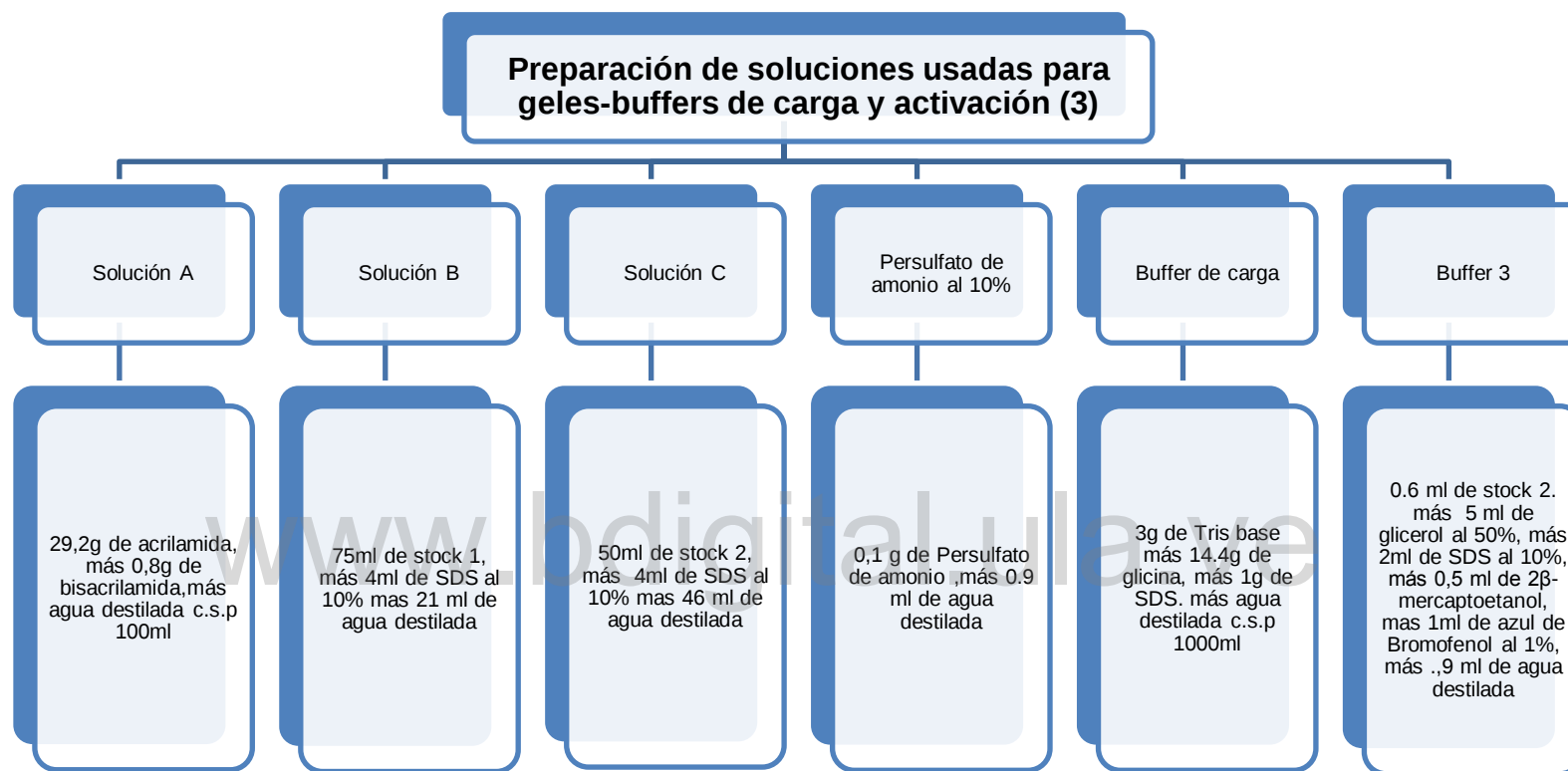


Figura 8. Preparación de las soluciones para aplicar el método de electroforesis desnaturalizante

Fuente: Bollag y col. (1996)

c.- Preparación de geles para electroforesis

Se prepararon dos geles de poliacrilamida (A y B). El primero (A) se obtuvo uniendo un gel de separación o resolución al 10% con un gel de concentración o apilamiento al 5%, mientras que el segundo (B) resultó de la unión de un gel de separación al 12,5% y otro gel de concentración o apilamiento al 5%, de acuerdo con la metodología propuesta por Bollag y Cols.(1996).

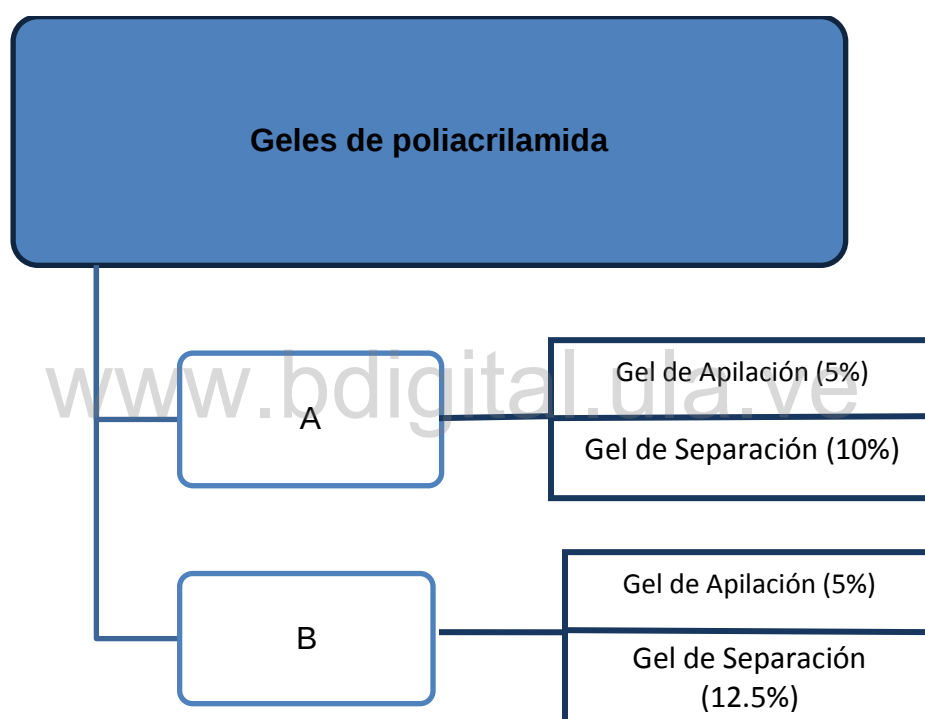


Figura 9. Composición de geles para SDS-PAGE

Fuente: Elaboración propia (2014)

- ***Preparación del gel de separación al 10 %***

Se mezclaron 3.3 mL de solución A con 2.5 mL de solución B y se agitaron. Luego se agregaron 4.17 mL de agua; se volvió a agitar, se

añadieron 50 μ L de persulfato de amonio, se mezcló y por último se colocaron 5 μ L de TEMED. (Bollag, Rizycky y Edelstein, 1996)

- ***Preparación del gel de separación al 12.5 %***

Se preparó una mezcla con 4.1mL de solución A, 2.5 mL de solución B, 3.4mL de agua, 50 μ L de persulfato de amonio y 5 μ L de TEMED. (Bollag, Rizycky y Edelstein, 1996)

- ***Preparación del gel de concentración al 5%***

El gel de concentración se preparó con 2.3mL de agua, 0.67mL de solución A, 1.0mL de solución C. Esta mezcla se agitó, luego se agregaron 30 μ L de persulfato de amonio y 5 μ L de TEMED. (Bollag, Rizycky y Edelstein, 1996)

d.- Preparación de las muestras para electroforesis

Cada muestra de fluido de quiste de mama se preparó con buffer de carga, en una relación 4:1 (4 μ L de muestra y 1 μ L de buffer). Posteriormente la preparación fue colocada en baño de maría, hirviendo durante 1 minuto aproximadamente, para desnaturalizar por completo las proteínas y/o concentrarlas. Luego se centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto (r.p.m.), durante dos minutos. El sobrenadante se usó para realizar la corrida electroforética.

e.- Preparación del sistema láminas-gel

Para montar dicho sistema, se armó el soporte del equipo de electroforesis colocando una lámina frente a la otra y enganchadas al soporte mediante dos pestañas ubicadas a la izquierda y derecha, respectivamente.

Entre ellas quedó una ranura o espacio libre y allí se vertió el gel de separación; se esperó aproximadamente 1 hora hasta que ocurrió la polimerización. Al pasar el tiempo indicado se procedió a colocar el gel de apilamiento encima del gel polimerizado y sobre él se fijó una especie de peine con hendiduras, que permitieron la formación de 10 pozos. Dicho sistema se colocó en la nevera hasta el siguiente día, cuando se sacaron los soportes para retirar con mucho cuidado las láminas y introducirlas en la cámara del equipo de electroforesis.

f.- Corrida electroforética

Se realizó la electroforesis iniciando a 70V, manteniéndose constante el tiempo necesario hasta que las muestras comiencen a entrar al gel de resolución. Inmediatamente se aumentó el voltaje a 100 V, esperando la culminación de la corrida en el momento que el azul de bromofenol llegó al final del gel. Después se retiró el gel de las láminas, se introdujo en un envase de plástico hermético y se coloreó con una solución de azul de Coomassie previamente preparada. Se dejó en reposo durante 1 hora; se extrajo el residuo del colorante y se aplicó el decolorante, que actuó hasta el día siguiente, para quitar el exceso de azul de Coomassie. Una vez aclaradas las bandas, se retiró el gel del envase y se introdujo en una bolsa plástica con cierre hermético. Se escaneó dicho gel y se realizaron mediciones desde la base del pozo hasta la banda, usando para ello una regla graduada.

g.- Marcador del peso molecular

La estimación del peso molecular de las muestras se realizó tomando como control una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos (albúmina, ovoalbúmina y lisozima), para hacer una curva de calibración por

cada gel. Al respecto, se usó como base la información contenida en la (tabla 1).

Tabla 1. Pesos moleculares de proteínas usadas como referencia

Proteína	Peso Molecular (KDa)
Albúmina	68
Ovoalbúmina	43
Lisozima	14,3

Fuente: Bollag, Rizycky y Edelstein (1996)

5.2.2. Espectrofotometría

Se disolvieron las muestras de los quistes de mama con solución salina fisiológica (SSF), la cual fue preparada previamente mezclando 0,9gr de cloruro de sodio (NaCl) y 100 mL de agua. Después, cada disolución se colocó en una cubeta y se procedió a medir la absorbancia usando diferentes rangos de longitud de onda. Dichos valores oscilaron entre 190 nm. y 290nm., así como 290nm. y 390 nm. los valores de absorción a 280 nm (proteínas) y 260 nm (ácidos nucleicos) fueron tratados matemáticamente como recomendando warburg y christhian, para estimar concentración de proteína y concentración por acidos nucleicos. (Warburg y christhian,1941)

5.2.3. Evaluación de actividad proteasa en placas de agarosa

Para determinar la actividad proteasa de las muestras de fluidos de quistes mamarios provenientes de los centros asistenciales de Valera y Barinas, se tomó como referencia el método empleado por Fuenmayor (2000), que consistió en bioensayos por difusión en placas de agarosa.

Inicialmente se modificó la preparación del buffer Barbitol. Para ello, se usaron 2.63 g de Barbitol sódico, disolviéndose con agua destilada c.s.p.

150 ml del buffer. Posteriormente se agregaron gotas de HCl 1N hasta llevarlo a un pH de 8.6. Luego se procedió a realizar la placa de agarosa donde se llevó a cabo el ensayo de actividad proteasa. Este procedimiento consistió en colocar 10 mL de buffer Barbital dentro de un vaso de precipitado, calentándose 10 segundos en el microondas, para luego agregar 0.8 g de agarosa. Se removió hasta lograr disolver la agarosa. La mezcla buffer Barbital +agarosa se calentó nuevamente y se agregó la cantidad óptima de leche karla (0.31 g y 0.62 g), agitando hasta disolverlo. Luego, se colocaron 3 mL de la preparación anterior en una lámina portaobjeto, dejándola gelificar. Al transcurrir el tiempo se elaboraron pozos de 3mm de diámetro y 2mm de profundidad. Después se tomaron tubos Eppendorf y se mezclaron 40 μ L de cada muestra de fluidos de quistes de mama con 10 μ L de los buffers 5, 6 y 7. Luego se hirvió dicha solución durante 3 minutos y por último se procedió a colocarlas en el sistema. Las placas se introdujeron en cámara húmeda. Todo el conjunto se llevó a la estufa a 37 °C por 24 horas para realizar las observaciones y anotaciones correspondientes.

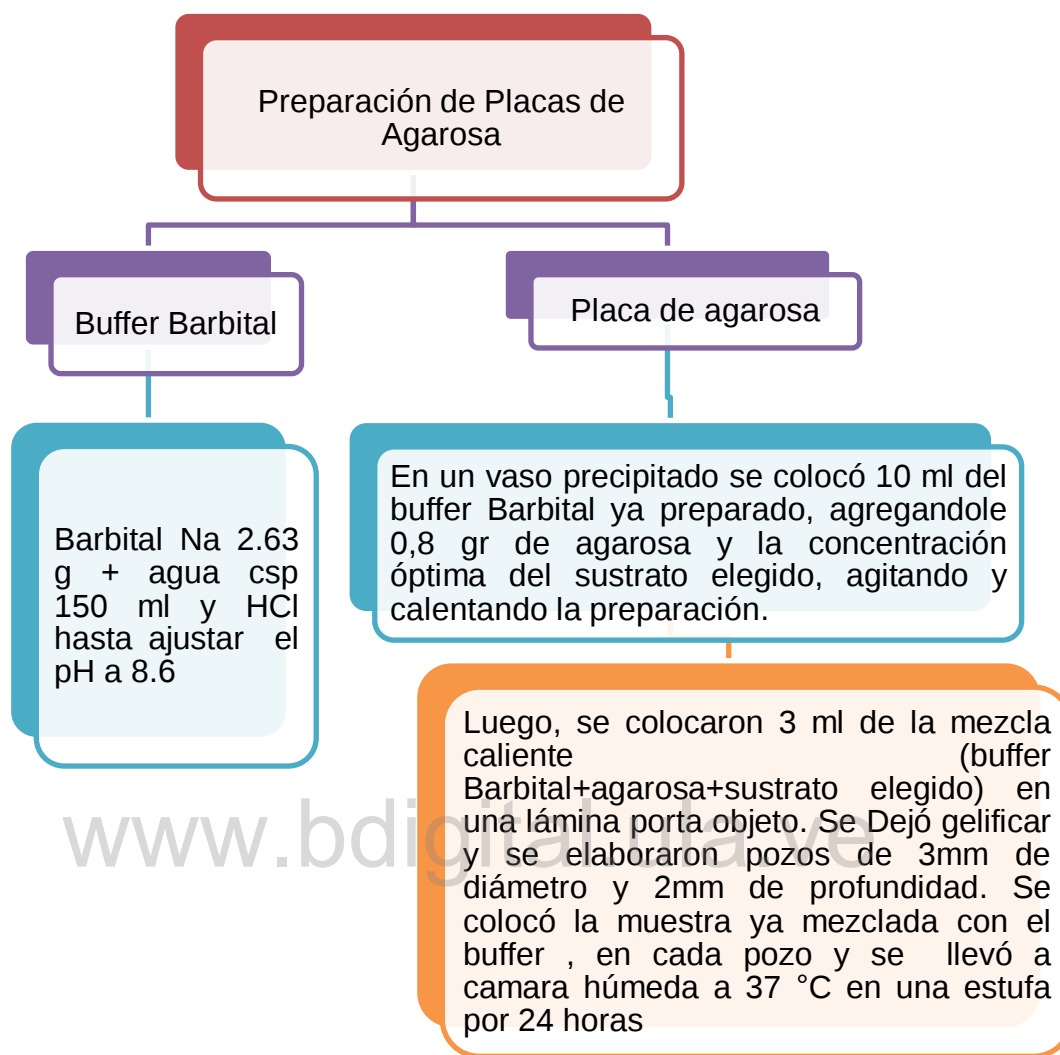


Figura 10. Ensayo de difusión con placas de agarosa

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

Para colocar a punto la técnica y obtener resultados satisfactorios, se llevaron a cabo diferentes ensayos, usando diferentes controles, variando las concentraciones del sustrato y eligiendo los buffer o soluciones madres indicadas. Esto se especifica a continuación.

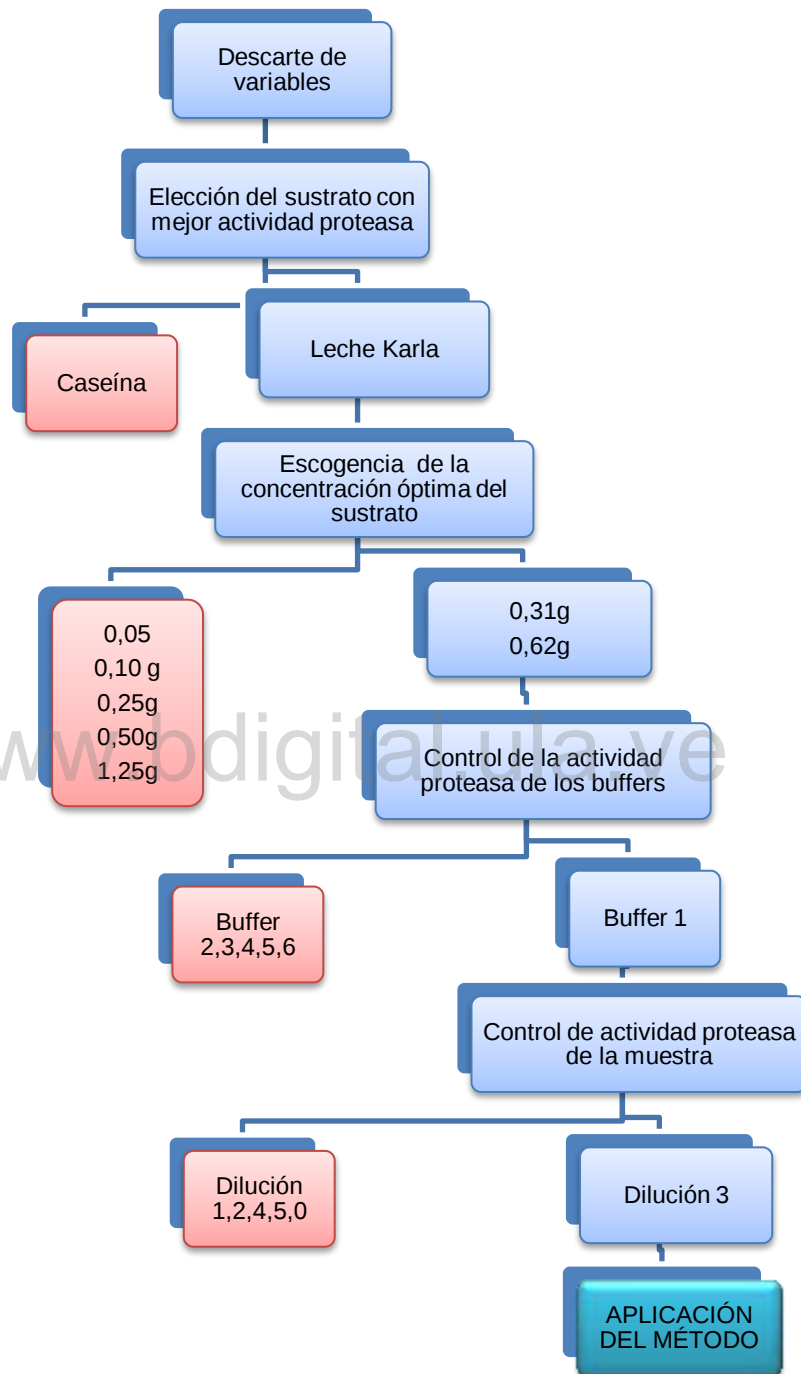


Figura 11. Descarte de variables.

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

Ensayo 1. Elección del Sustrato con mejor actividad proteasa

Para elegir el sustrato óptimo, se tomó como norma de elección la nitidez o mejor visualización del halo, así como su radio, el cual fue medido con una regla graduada desde el borde del pozo hasta su parte externa. Se realizó el método descrito anteriormente dos veces de manera simultánea, usando como sustrato la caseína y la leche Karla respectivamente para luego establecer la comparación entre los resultados obtenidos.

Ensayo 2. Escogencia de la concentración óptima del sustrato

Luego de elegir el mejor sustrato, se prepararon placas con diferentes concentraciones del mismo, colocando en cada pozo muestras de extracto de frutas, lactobacilos, quistes de mamás y ovoalbúmina que previamente habían sido preparadas en estudios anteriores. Se aplicó todo el método y para escoger la concentración óptima del sustrato se empleó como criterio la difusión de la muestra en la placa respectiva.

Ensayo 3. Control de la actividad proteasa de los buffers

Se prepararon cuatro soluciones madre o buffer. La norma empleada consistió en verificar que la actividad proteasa de estas soluciones stock fuera negativa.

- Buffer 1: se agrega Tris base 0.3 mL y pH 8.8, β -mercaptoetanol 0.25gr y la cantidad restante de agua destilada.
- Buffer 2: Tris base 0.3 mL y pH 8.8, β -mercaptoetanol 0.25 gr, 1mL de SDS al 10 % y la cantidad restante de agua destilada.

- Buffer 3: Tris base 0.3 mL y pH 8.8, β -mercaptoetanol 0.25 gr, 1mL de SDS al 10 %, 0.5 mL azul de bromofenol y la cantidad restante de agua destilada.

Cada uno de los buffer preparados anteriormente, se colocaron en los pozos sin las muestras, para determinar presencia o ausencia de actividad proteasa.

Ensayo 4. Comparación entre el efecto de los detergentes SDS, TWEEN y el reactivo β -mercaptoetanol en la actividad proteasa de las soluciones stock

Se procedió a preparar 5mL de tres nuevas soluciones madre diferentes a los buffers 1, 2, y 3.

- Buffer 4: Tris base 0.3 mL a pH 8.8, 1 mL de tween y la cantidad restante de agua destilada.
- Buffer 5: Tris base 0.3 mL a pH 8.8, 0.25mL de β -mercaptoetanol, 1mL de tween y la cantidad restante de agua destilada.
- Buffer 6: Tris base 0.3 mL, 0.25mL de β -mercaptoetanol, 1mL de tween, 0.5 mL de azul de bromofenol y la cantidad restante en agua destilada.

Ensayo 5. Control de la actividad proteasa de la muestra

Se procedió a buscar un control positivo de la muestra. Para ello se usó el ananase, medicamento comercial compuesto por un concentrado de enzimas proteolíticas de la piña. Se disolvió una gragea de esta sustancia en agua destilada estéril y se mezcló con el buffer previamente seleccionado como apto para mezclarse con la muestra, como sigue:

- 40μL de ananase disuelta + 10μL de buffer. Esta solución se tomó como base y a partir de la misma se realizaron las siguientes diluciones:

Dilución 1: 9 de ananase- 1 de buffer 1

Dilución 2:4 de ananase- 1 de buffer 1

Dilución 3:3 de ananase- 1 de buffer 1

Dilución 4:2 de ananase- 2 de buffer 1

Dilución 5:1 de ananase- 3 de buffer 1

Sin diluir: 0 de ananase- 1 de buffer 1

Ensayo 6. Aplicación del método de difusión de placas usando el sustrato, las muestras de quistes de mama y el buffer seleccionado

Se obtuvieron varias placas mezclando buffer Barbital con agarosa y las dos concentraciones de sustrato, respectivamente. Luego se colocaron en los pozos 10 μl de las muestras puras de quistes de mama y 10 μl de muestras mezcladas con el buffer seleccionado, en dos ensayos simultáneamente, aplicando el método en su totalidad.

Para **determinar la presencia de actividad específica proteasa** fue necesario realizar varios cálculos previos. Los mismos fueron:

a.- Unidad de enzima (U).

Se define como la cantidad de enzima que genera un halo de 1,0 mm (factor de conversión), en 24 horas para las condiciones ensayadas de temperatura (37°C), pH del buffer barbital (8.6) y el sustrato (leche Karla) a una concentración de 0,31g/ml ó 0,62g/ml, en un portaobjeto con agarosa al 0,8%, de 3mm de espesor, en cámara húmeda.

Entonces es necesario estimar el halo desde el borde del pozo hasta el borde del sitio donde cesa. En esencia es la distancia en mm de halo claro o turbio.

$$\frac{\text{Distancia del halo en 24 horas (mm)}}{1,0 \text{ mm}} \quad \text{Ec. (1)}$$

1,0 mm

b.- Unidades de enzima por mililitro (U/ml)

Matemáticamente se define como:

$$\frac{\text{Unidades de enzima}}{\text{Unidad de volumen usado en el ensayo en ml}} \quad \text{Ec. (2)}$$

Unidad de volumen usado en el ensayo en ml

c.- Cálculo de actividad específica proteasa AE (U/mg proteína)

$$AE = \frac{U/\cancel{\text{ml}}}{\text{conc. de proteínas obtenida en espectrofotometría } \cancel{\text{mg/ml}}} \quad \text{Ec. (3)}$$

d.- Cálculo del índice de la expresión molecular (EM) del material biológico.

$$EM = \frac{AE \left(\frac{U}{\text{mg}} \text{ proteína} \right)}{\text{conc. de ácidos nucleicos obtenida en espectrofotometría } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ proteínas} \right)} = \frac{U}{(\text{mg AN} * \text{mgP/ml})} \quad \text{Ec. (4)}$$

6. RESULTADOS

El siguiente apartado trata sobre la presentación, análisis y discusión de los resultados obtenidos una vez estudiadas las 12 muestras de fluidos de quistes de mama provenientes de la ciudad de Valera, con la intención de dar respuesta a las interrogantes formuladas al iniciarse la investigación,

cuyo objetivo principal fue evaluar el perfil proteico y la actividad proteasa de fluidos de quistes de mama a través de métodos analíticos.

6.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.

A continuación se especifica la nomenclatura empleada en las páginas subsiguientes, con el propósito de presentar con claridad y precisión los resultados arrojados en la aplicación del método de electroforesis.

Tabla 2. Nomenclatura de las muestras de fluido de quistes de mama

Nº de muestra del fluido de quiste de mama	Nomenclatura
1	1B
2	2B
3	3B
4	4V
5	5V
6	6V
7	7V
8	8V
9	9V
10	10V
11	11V
12	12V

Fuente: Elaboración propia (2014)

Este procedimiento se puso en práctica empleando 6 geles de poliacrilamida, 3 (A1, A2 y A3) al 10% de concentración y el resto (B1, B2 y B3) al 12,5%.

6.1.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en tres geles de poliacrilamida (A1, A2 y A3) al 10%

Con el gel A1 se observó el patrón de bandeo de las muestras 1, 9, 10 y 11, el cual arrojó un mínimo de 3 y un máximo de 4 bandas de proteínas. (Fig. 12)

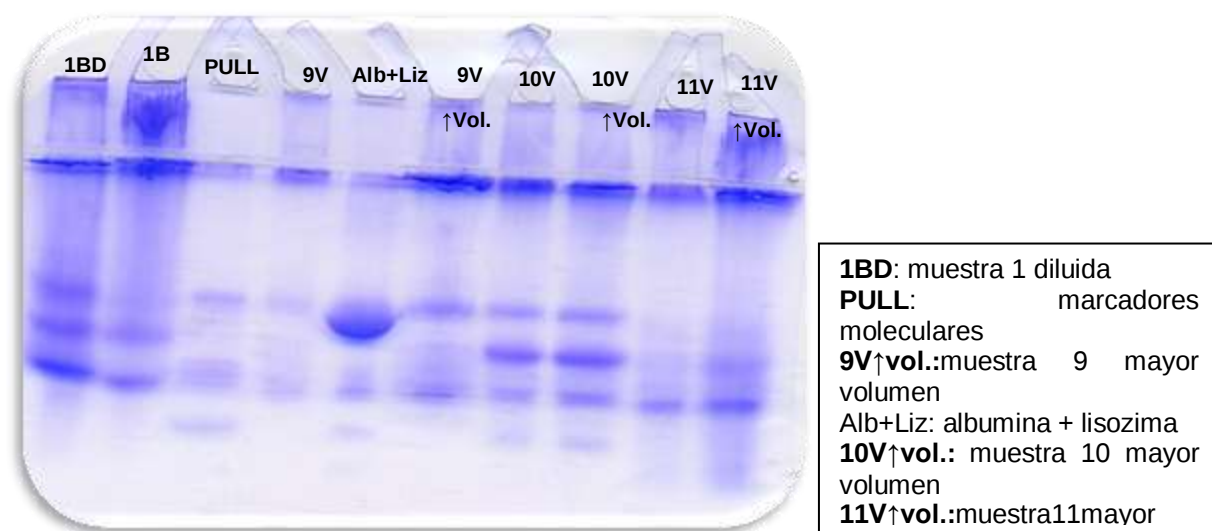


Figura 12. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A1) de fluidos de quiste de mama

Para el gel A2, el patrón de bandeo de las muestras 2, 3, 5, 8 y 12, osciló entre 3 y 7 bandas de proteínas. (Fig. 13)

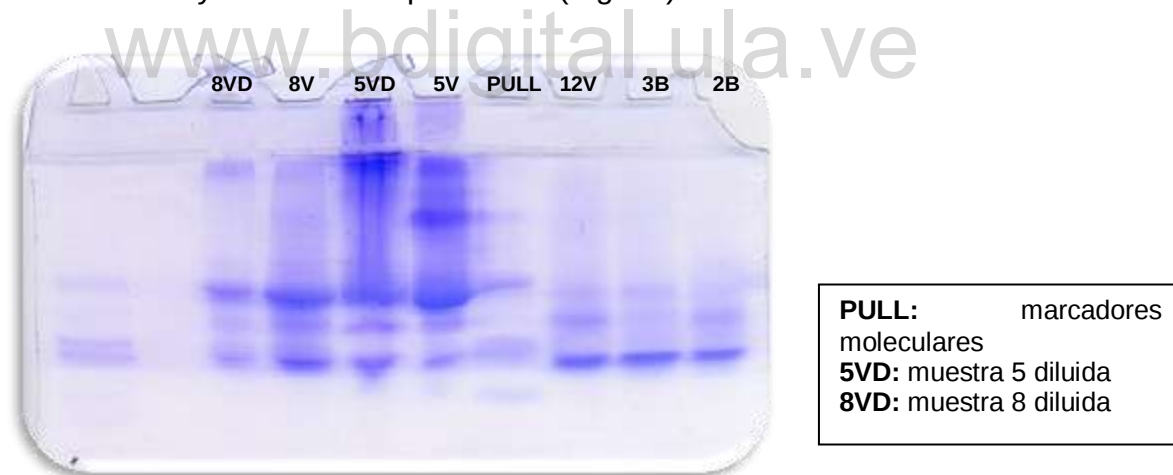


Figura 13. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A2) de fluidos de quiste de mama

El gel A3 arrojó un patrón de bandeo para las muestras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12, con un mínimo de 2 y un máximo de 5 bandas de proteínas. (Fig. 14)

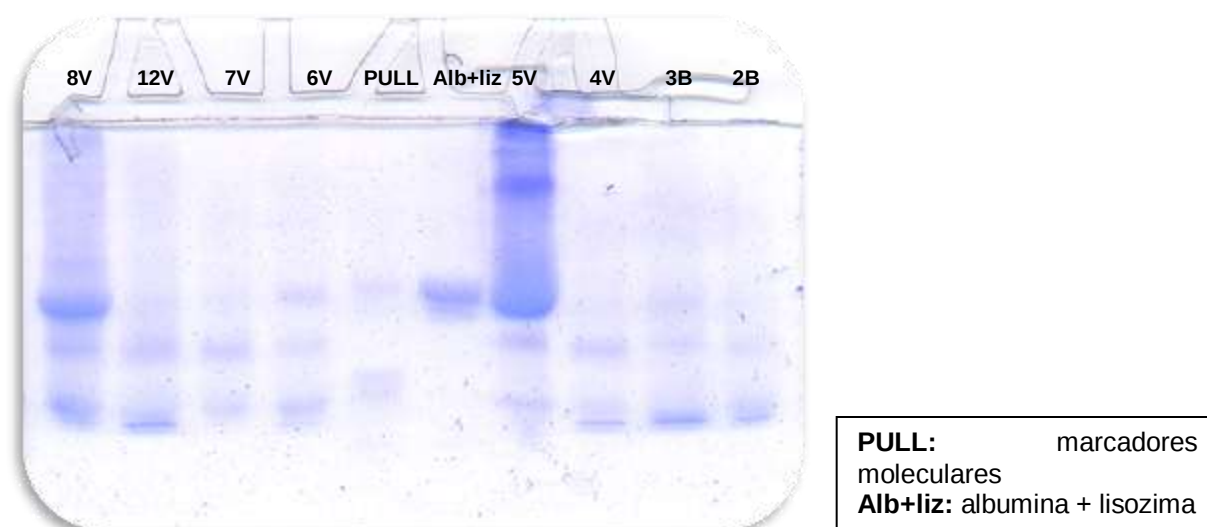


Figura 14. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 10% (A3) de fluidos de quiste de mama.

6.1.1.1. Evaluación de las muestras de los fluidos de quistes sembradas en geles de poliacrilamida al 10%

Una vez obtenidos los patrones de bandeo en los tres geles al 10% de concentración (A1, A2 y A3), los mismos fueron promediados en función del valor del peso molecular calculado al evaluar la curva de calibración según el R_f ó distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida (ver anexo 1). Posteriormente, las masas halladas se ordenaron de mayor a menor en segmentos de amplitud 10 KDa, iniciando en 0 KDa como límite inferior. (0-10 KDa; 10-20 KDa y así sucesivamente hasta incluir al mayor de los pesos moleculares obtenidos). Los resultados se presentan a continuación. (Tabla 3).

Tabla 3. Pesos moleculares obtenidos por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE al 10% de los fluidos de los quiste de mama estudiados.

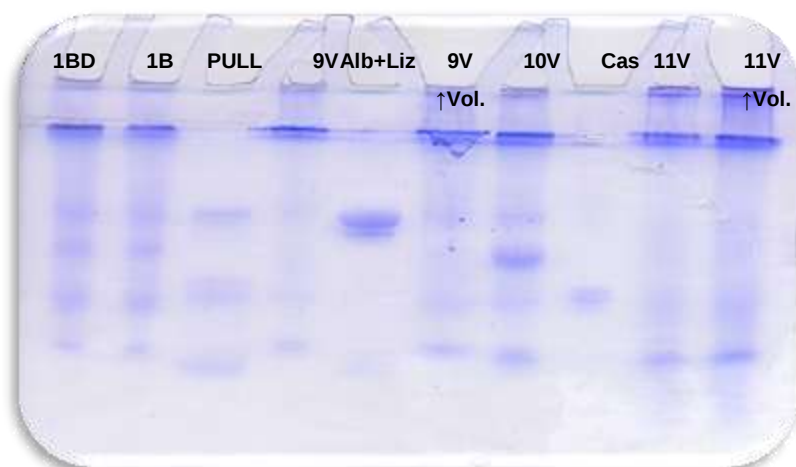
Geles de 10% Pesos moleculares (KDa)												
Banda	1B	2B	3B	4V	5V	6V	7V	8V	9V	10V	11V	12V
1					131,84							
2					116,29							
3					109,85							
4					98,58							
5								78,56				
	77,11								75,33	75,33		
											73,33	
6						67,54						
							64,54					
		64,16	64,16									64,16
7								62,68				
	59,29								59,29			
					57,90							57,53
8			51,72					51,72				
												49,42
											48,59	
9					42,50							
10											39,11	
								38,68				
		38,25	38,25	38,25		38,25	38,25					38,25
11	36,11									36,11		
					33,21							
12		30,26	30,26									30,26
13									19,94			
					16,83							
13						8,45	8,45	8,45				8,45
		6,70	6,70	6,70								

Fuente: Elaboración propia (2014)

La estimación de los pesos moleculares de las proteínas presentes en los fluidos de quistes de mama estudiados en el gel de resolución al 10%, arrojó un bandeo de 13 proteínas, cuyas masas oscilaron entre 6,7 KDa y 131,84 KDa. En tal sentido, se observó que la muestra 5B presentó 5 proteínas no encontradas en las demás muestras, con pesos moleculares de 131,84 KDa, 116,29 KDa, 109,85 KDa, 96,58 KDa y 42,50 KDa, respectivamente; las muestras 1B, 8V, 9V, 10V y 11V presentaron la banda 5 con pesos moleculares de 78,56 KDa, 77,11 KDa, 75,33 KDa, 73,33 KDa; la banda 6 de 67,54 KDa, 64,54 KDa, 64,19 KDa, 62,68 KDa, se encontró en 2B, 3B, 6V, 7V, 8V y 12V; los pesos moleculares 59,29 KDa, 57,90 KDa y 57,53 KDa de la banda 7, se mostró en las muestras 1B, 5V, 10V y 12V; la banda 8 de pesos moleculares 51,72 KDa, 49,42 KDa y 48,59 KDa, se encontró en las muestras 3B, 8V, 11V, 12V; todas las muestras de los fluidos de quiste de mama presentaron la banda 10 con pesos moleculares de 39,11 KDa, 38,68 KDa, 38,25 KDa y 36,11 KDa; la banda 11 solo se observó en las muestras 2B, 3B y 12V con peso de 30,26 KDa; las muestras 5V y 10V, obtuvieron la banda 12 de 19,94 KDa y 16,83 KDa y por último se presentó la banda 13 en las muestras 2B, 3B, 4V, 6V, 7V, 8V y 12V con pesos moleculares de 8,45 KDa y 6,70 KDa.

6.1.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (B1, B2 y B3) al 12,5% del fluido de quiste de mama

Las muestras de fluidos de quiste de mama sembradas en el gel B1, arrojaron un mínimo de 2 y un máximo de 4 bandas de proteínas. (Fig. 15)



1BD: muestra 1 diluida
PULL: marcadores moleculares
Alb+Liz: albumina + lisozima
9V↑vol: muestra 9 mayor volumen
Cas: caseína pura
11V↑vol: muestra 11 mayor

Figura 15. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B1) de fluidos de quiste de mama.

El patrón de bandeo obtenido usando el gel B2 en el cual se sembraron las muestras 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 12, osciló entre 4 y 6 bandas de proteínas. (Fig.16)



PULL: marcadores moleculares
5VD: muestra 5 diluida

Figura 16. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B2) de fluidos de quiste de mama.

En el gel B3, el patrón de bandeo de las muestras 2, 3, 6, 7, 8 y 12, osciló entre 4 y 5 bandas de proteínas. (Fig.17)

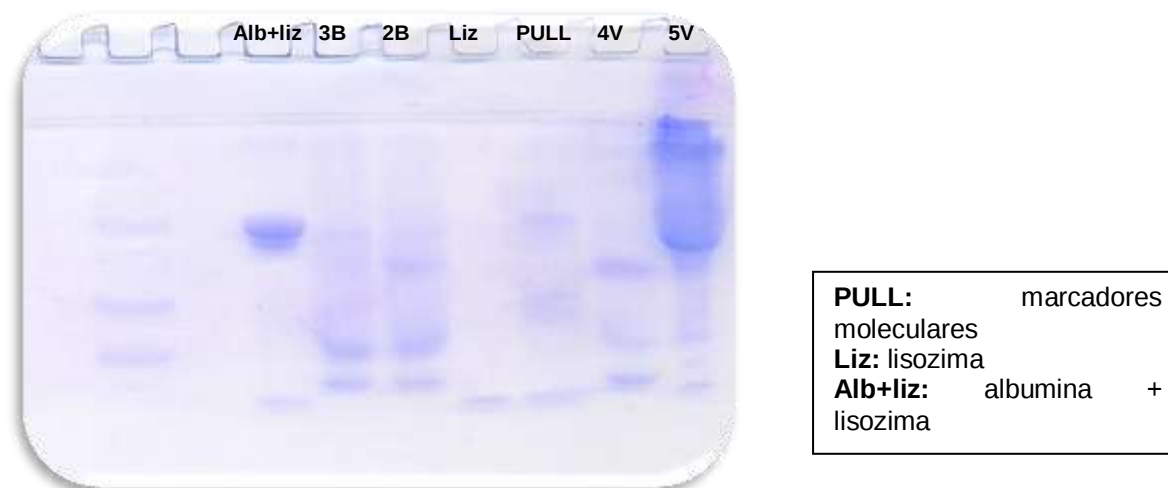


Figura 17. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12,5% (B3) de fluidos de quiste de mama.

6.1.2.1. Evaluación de las muestras de los fluidos de quistes sembradas en geles de poliacrilamida al 12,5%

Los patrones de bandeo mostrados en los tres geles al 12,5% de concentración (B1, B2 y B3), se promediaron de acuerdo con el valor del peso molecular calculado (curva de calibración según el Rf ó distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida. Ver anexo 1). Se hizo un listado de las medias de los pesos moleculares en forma decreciente, en 8 grupos de amplitud 10 KDa, (80-90 KDa; 70-60 KDa y así sucesivamente hasta incluir al menor de los pesos moleculares obtenidos). Los resultados se presentan a continuación. (Tabla 4).

Tabla 4. Pesos moleculares obtenidos por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE al 12,5 % de los fluidos de los quistes de mama estudiados

Geles 12,5% Pesos moleculares (KDa)												
Banda	1B	2B	3B	4V	5V	6V	7V	8V	9V	10V	11V	12V
1					81,32							
2								71,21				
3						66,54	66,54					
		64,75	64,75									64,75
					63,89				63,91	63,91		
4	61,13											
								59,62				
		56,45	56,45									
					54,22		55,55					55,52
5									50,56	50,56		
								50,27				
			49,38									
6				47,44	47,44							47,44
									36,09	36,09	36,09	
							34,93					
	33,87											
7						30,72						
								29,88				
					29,05							
							25,35					
		25,19										
			25,16									25,16

8				23,24								
	19,41										19,41	
							18,22					
						18,19						
												17,33
9				16,47								
		16,36	16,36					16,36				
									16,07	16,07		
					12,60							

Fuente: Elaboración propia (2014)

www.bdigital.ula.ve

La evaluación del fluido de quistes de mama mostró en el gel de 12,5% un total de 9 bandas de proteína con masas moleculares que oscilan entre 16,75 KDa y 81,32 KDa. Según los datos tabulados (Tabla 4), puede verse que la banda 1 (81,32 KDa) solo se estimó en la muestra 5V; banda proteína 2 (73,70 KDa) se identificó en la muestra 8V; banda proteína 3 de (66,54 KDa, 64,75 KDa, 63,91 KDa y 63,89 KDa) se encontraron en las muestras 2B, 3B, 5V, 6V, 7V, 8V, 9V, 10V y 12V, la banda 4 estaba presente en las muestras 1B, 2B, 3B, 5V, 7V, 8V y 12V con pesos de (61,13 KDa, 59,62 KDa, 56,45 KDa, 55,55 KDa y 55,52 KDa), las muestras 3B, 4V, 5V, 8V, 9V, 10V y 12V, obtuvieron pesos moleculares de (54,22 KDa, 50,56 KDa 50,27 KDa 4,38 KDa y 47,44 KDa), la banda 6 presento pesos de (36,09 KDa, 34,3 KDa, 33,87 KDa y 30,72 KDa) en las muestras 1B, 6V, 7V, 9V, 10V y 11V, los pesos moleculares (29,88; 29,05; 25,35; 25,19 y 25,16 KDa) se observaron en las muestras 2B, 3B, 5V, 7V, 8V y 12V, en la banda 8 de (23,24; 19,41; 18,22 y 17,33 KDa) se encontraron las muestras 1B, 4V, 6V, 7V, 11V y 12V y por último las muestras 2B, 3B, 4V, 5V, 8V, 9V y 10V de pesos (16,47; 16,36; 16,07 y 12, 60 KDa) presentaron la banda 9.

6.2. Determinación de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos usando el método de espectrofotometría

Este método se llevó a cabo para identificar la concentración de proteínas ácidos nucleicos presentes en las muestras de fluidos de quistes de mama. Las mismas fueron diluidas con solución salina fisiológica (SSF), previamente preparada con 0,9g de cloruro de sodio y 100ml de agua. Luego se midió la Absorbancia a diferentes rangos de longitud de onda de 190 a 290 y 290 a 390nm, obteniéndose lo siguiente:

Tabla 5. Determinación de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos, por el método de Warburg y Christian.

Proteína (mg/ml)= (A280)	1B Dilución 1:100	2B Dilución 1:100	3B Dilución 1:100	4V Dilución 1:100	5V Dilución 1:100	6V Dilución 1:150	7V Dilución 1:100	8V Dilución 1:500	9V Dilución 1:100	10V Dilución 1:100	11V Dilución 1:100	12V Dilución 1:300
Absorbancia a 280 (A280)	0.386	0.808	0.752	0.559	0.384	0.483	0.550	0.234	0.431	0.557	0.629	0.799
Absorbancia a 260nm (A260)	0.609	0.792	0.802	0.610	0.275	0.508	0.578	0.251	0.418	0.609	0.693	0.799
A280/A260	0.91	1.02	0.94	0.92	1.40	0.95	0.95	0.93	1.03	0.91	0.91	1.00
(*) Factor de corrección (FC)	0.74	0.81	0.74	0.74	1.02	0.74	0.74	0.74	0.81	0.74	0.74	0.78
(*)% ácido nucleico	4.00	3.50	4.00	4.00	0.75	4.00	4.00	4.00	3.50	4.00	4.00	3.50
Concentración de proteína (mg/ml) [(A280)*FC]=CP]	0.41	0.65	0.56	0.41	0.39	0.36	0.41	0.17	0.35	0.41	0.47	0,62
Concentración de proteínas corregidas con el factor de dilución (mg/ml) [CPC * FD]	39	65	56	41	39	54	41	85	35	41	47	186
Concentración de ácidos nucleicos (mg/ml) [CPC * % AN]	1.6	2.3	2.2	1.6	0.3	2.2	1.6	3.4	1.2	1.6	1.9	6,5

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

De acuerdo con los datos obtenidos en la (tabla 5), pudo observarse que la concentración de proteínas corregidas con el factor de dilución (CPC) osciló entre 35 mg/ml para la muestra 9V y 186 mg/ml en la muestra 12V. Por otra parte, el menor valor de concentración de ácidos nucleico fue de 0,3 mg/ml (5V) y el mayor, 6,5 mg/ml (12V)

Cabe destacar que la muestra doce (12V) presentó mayor concentración tanto de proteínas corregidas con el factor de dilución como de ácidos nucleico. Tales cantidades son 186 mg/ml y 6,5 mg/ml respectivamente. Así mismo las concentraciones referidas.

(Ver últimas 2 columnas de la tabla 5) se usaron para calcular la proporción de actividad específica proteasa por concentración de ácidos nucleico. Esto se logró mediante la determinación de la actividad proteasa de los fluidos de quiste de mama usando geles de agarosa.

6.3 Determinación de la actividad específica proteasa de los fluidos de quistes de mama usando geles de agarosa.

Para la aplicación de esta técnica el material biológico examinado fue identificado según esta simbología.

Tabla 6. Nomenclatura y aspecto de las muestras de fluido de quistes de mama

Muestra	Nomenclatura	Aspecto de la muestra
1	1B	Marrón oscura
2	2B	Marrón clara
3	3B	Marrón clara
4	4V	Marrón clara
5	5 V	Ámbar
6	6 V	Beige
7	7 V	Beige
8	8 V	Marrón clara
9	9 V	Marrón clara
10	10 V	Ámbar
11	11 V	Beige
12	12 V	Gris

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

Como puede notarse en la tabla anterior (tabla 6), el aspecto de la muestra se definió en función de la coloración que presentó cada uno de los fluidos (beige-marrón claro-ámbar-marrón oscuro-gris).

6.3.1. Elección de sustrato (tipo y concentración) y buffer

Durante la aplicación de este método, se observó actividad proteasa en todos los casos, por lo tanto, se decidió evaluar cuál era el sustrato y la concentración óptima del mismo, con el fin de poner a punto la técnica para el desarrollo de la investigación planteada.

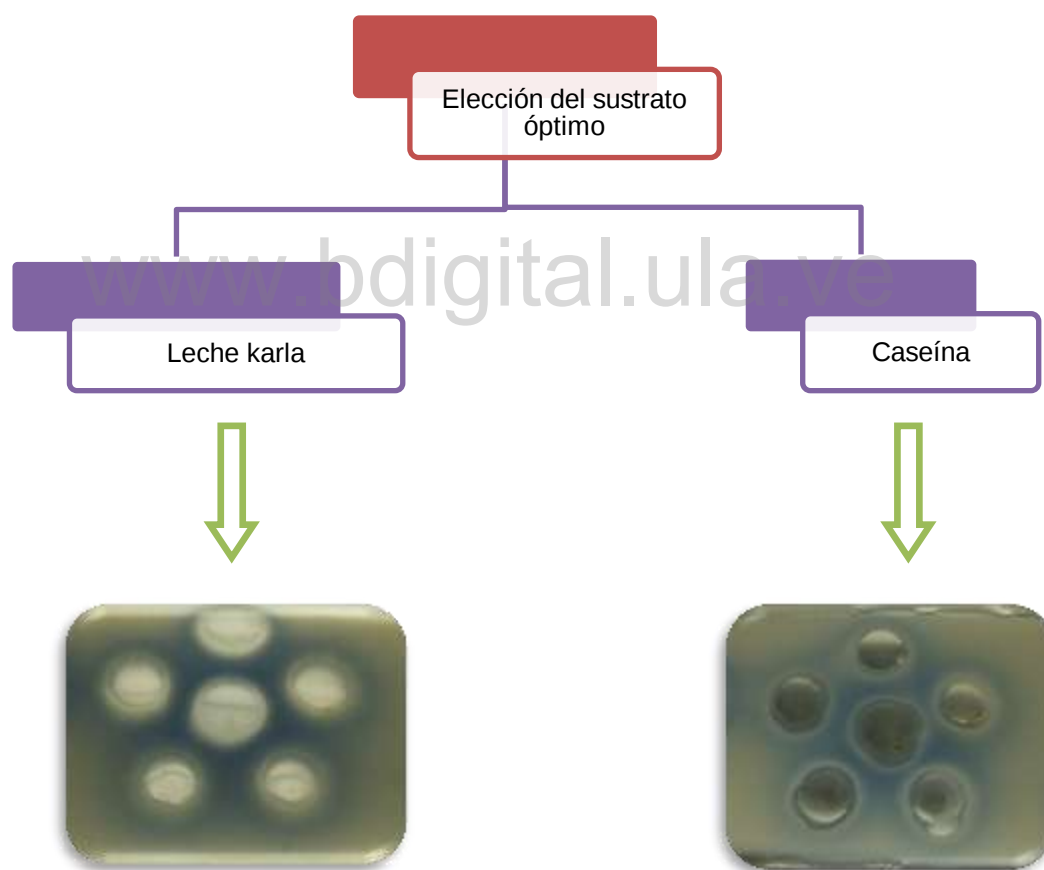


Figura 18. Esquema de elección del sustrato

Al comparar los resultados, se observó que las muestras sembradas en los pozos de gel de agarosa mezclado con leche Karla como sustrato, mostraron mayor nitidez (halos transparentes y mejor definidos). Por tanto, se escogió dicho sustrato.

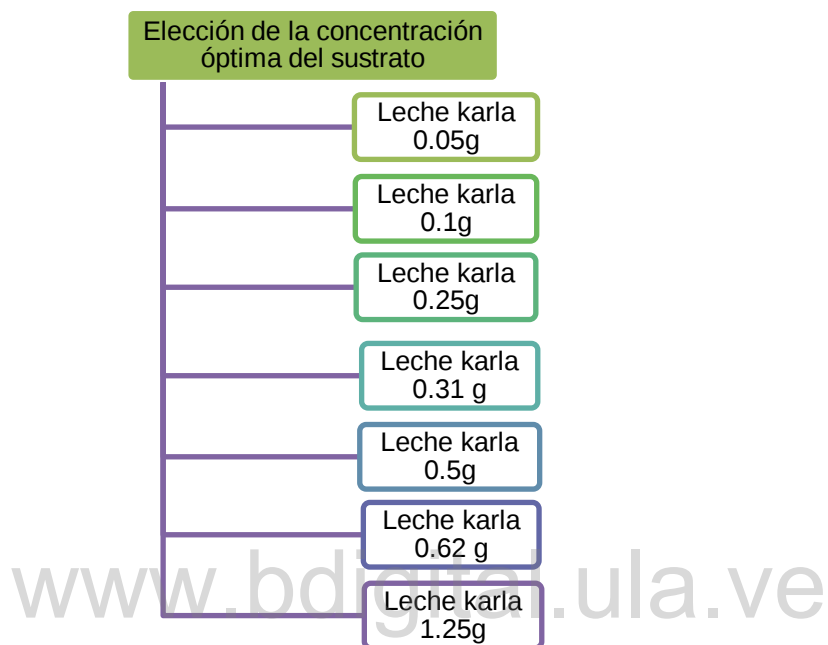


Figura.19 Esquema de elección de la concentración del sustrato

La actividad proteasa de las proteínas presentes en las muestras, se evidenció claramente para concentraciones de leche Karla de 0.31 g y 0.62 g.

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación del buffer óptimo, donde se observó actividad en algunos controles negativos (buffer 2 y 3), presumiendo que el detergente SDS, arrojó falsos positivos.

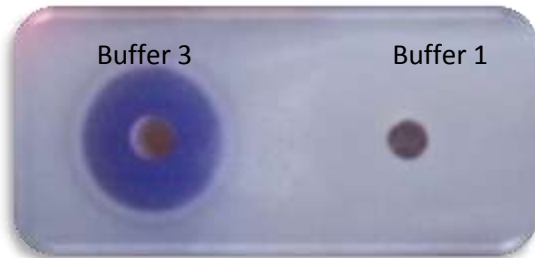


Figura 20. Evidencia de halos de actividad en los buffers

En resumen, el buffer óptimo para determinar actividad en las proteínas presentes en los fluidos de quistes de mama, fue el número uno (1), debido a que no mostró actividad, como se esperaba. Luego, se procedió a buscar un control positivo, usando el Ananase (medicamento compuesto por un concentrado de enzimas proteolíticas de la piña) mezclado con agua destilada estéril, observando resultados positivos, siendo evidente un gran halo.



Figura 21. Evidencia de halos de actividad en el Ananase.

Se realizaron 4 ensayos para determinar la actividad específica proteasa de acuerdo con las condiciones ensayadas de temperatura, pH y sustrato. Los cálculos obtenidos con 0,31 g de leche Karla (sustrato), sin buffer y para un volumen usado de 10 μ l son los siguientes:

a.- Unidad de enzima (U)

$$U = \frac{6 \text{ mm}}{1 \text{ mm}} = 6U$$

b.- Unidad de enzima por mililitro (U/ml)

$$\frac{6 U}{0,010 \text{ ml}} = 600 \text{ U/ml}$$

c.- Cálculo de actividad específica proteasa AE (U/mg proteína)

$$AE = \frac{600 \text{ U/ml}}{39 \text{ mg/ml}}$$

$$AE = 15.4 \text{ U/mg proteínas}$$

d.- Cálculo de la expresión molecular (EM) del material biológico.

$$EM = \frac{15.4 \text{ U/mg}}{0.3 \text{ mg/ml}}$$

$$EM = 51.3 \frac{U}{(\text{mg AN} * \text{mgProt/ml})}$$

Tabla 7. Actividad específica para un volumen de 10µl, sin buffer y usando 0,31 g de sustrato

Muestras	mg de proteína en 10µl	Aspecto del halo T= turbio C= claro	Distancia del halo a las 24 horas (mm)	Unidades de enzima	U/ml	UAE (Unidad de actividad específica) U/mg de proteína	EM (Actividad específica/ácidos nucleicos)
1B	0.39	T	6	6	600	15.4	51.3
2B	0.65	T	4	4	400	6.2	2.7
3B	0.56	T	4	4	400	7.1	3.2
4V	0.41	T	2	2	200	4.9	3.1
5V	0.39	C	5	5	500	12.8	42.7
6V	0.54	C	4	4	400	7.4	3.4
7V	0.41	T	2	2	200	4.9	3.1
8V	0.85	C	9	9	900	10.6	3.1
9V	0.35	-	-	-	-	-	-
10V	0.41	-	-	-	-	-	-
11V	0.47	C	10	10	1000	21.3	11.2
12V	1.86	T	6	6	600	3.2	0.5

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

Según los cálculos obtenidos en la (tabla 7) la actividad específica proteasa oscila entre 3,2 U/mg de proteína y 21,3 U/mg de proteína, más unidades en menos proteínas, siendo la muestra 11V la que presenta mayor pureza, seguida de la 1B, 5V, 8V, 6V, 3B, 2B, 4V-7V y en última posición, la muestra 12V

Tabla 8. Actividad específica para un volumen de 8µl, con buffer y usando 0,31 g de sustrato

Muestra	mg de proteína 8µl	Aspecto del halo T= turbio C= claro	Distancia del halo a las 24 horas (mm)	Unidades de enzima	U/ml	Actividad específica proteasa (U/mg de proteína)	EM (Actividad específica/ácidos nucleicos)
1B	032	T	6	6	750	19.2	64.0
2B	0.52	T	5	5	625	9,6	4.2
3B	0.44	T	5	5	625	11,2	5.1
4V	0.32	T	4	4	500	12,2	7.6
5V	0.31	C	4	4	500	12,8	42.3
6V	0.43	C	4	4	500	9,3	4.2
7V	0.32	C	4	4	500	12,2	7.6
8V	0.68	C	9	9	1125	13,2	3.9
9V	0.28	T	3	3	375	10,7	8.9
10V	032	T	4	4	500	12,2	7.6
11V	0.37	C	10	10	1250	26,6	14.0
12V	1.48	C	7	7	875	4,7	0.7

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

De acuerdo a los valores de actividad específica proteasa la muestra 11V es la más activa enzimáticamente y continua en orden decreciente la 1B, 8V, 5V, 4V-7V-10, 3B, 9V, 2B y por último, la muestra 12V.

El índice de la expresión molecular del material biológico está representada por el cociente entre la actividad específica proteasa y la concentración de ácidos nucleicos obtenida mediante el método de espectrofotometría es mayor para la muestra 1B(64 U.ml/mg²) mientras que la muestra 12V presenta el valor más bajo (0,7 U.ml/mg²), lo cual indica que presentan mayor cantidad de ácidos nucleicos por unidad enzimática y por tanto, de material genético y/o de expresión molecular.

Tabla 9. Actividad específica para un volumen de 10µl, sin buffer y usando 0,62 g de sustrato

Muestra	mg de proteína 10µl	Aspecto del halo T= turbio C= claro	Distancia del halo a las 24 horas (mm)	Unidades de enzima	U/ml	Actividad específica proteasa (U/mg de proteína)	EM (Actividad específica/ácidos nucleicos)
1B	0.39	T	8	8	800	20.5	68.3
2B	0.65	T	3	3	300	4.6	2.0
3B	0.56	T	3	3	300	5.4	2.5
4V	0.41	T	3	3	300	7.3	4.6
5V	0.39	C	5	5	500	12.8	42.7
6V	0.54	C	4	4	400	7.4	3.4
7V	0.41	T	3	3	300	7.3	4.6
8V	0.85	T	6	6	600	7.1	2.1
9V	0.35	-	-	-	-	-	-
10V	0.41	-	-	-	-	-	-
11V	0.47	C	8	8	800	17.0	8.9
12V	1.86	T	4	4	400	2.2	0.3

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

La determinación de actividad específica sin usar buffer y con una concentración de sustrato duplicada (0,62 g) arrojó resultados que oscilan en forma decreciente desde 25,6 U/mg de proteína y 2,7 U/mg de proteína, correspondiendo para cada muestra e orden siguiente: 1B, 11V, 5V, 6V, 4V-7V, 8V, 3B, 2B y por último, la muestra 12V.

Tabla 10. Actividad específica para un volumen de 8µl, con buffer y usando 0,62 g de sustrato

Muestra	mg de proteína 8µl	Aspecto del halo T= turbio C= claro	Distancia del halo a las 24 horas (mm)	Unidades de enzima	U/ml	Actividad específica proteasa (U/mg de proteína)	UAE/ AN (actividad específica proteasa /concentración de ácidos nucleicos)
1B	0,32	T	8	8	1000	25.6	85.3
2B	0,52	T	7	7	875	13.5	5.9
3B	0,44	T	6	6	750	13.4	6.1
4V	0,32	T	4	4	500	12.2	7.6
5V	0,31	T	6	6	750	19.2	64.0
6V	0,43	T	6	6	750	13.9	6.3
7V	0,32	T	4	4	500	12.2	7.6
8V	0,68	T	6	6	750	8.8	2.6
9V	0,28	T	4	4	500	14.3	11.9
10V	0,32	T	7	7	875	21.3	13.3
11V	0,37	C	8	8	1000	21.3	11.2
12V	1,48	T	5	5	625	3.4	0.5

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

Los cálculos presentados en la (tabla 10) para un sustrato de (0,62g) usando buffer, indican que la muestra con mayor actividad específica proteasa es la 1B, con un valor de 25,6 U/mg de proteína. Además, la muestra 12V fue la que arrojó menor proporción de pureza (3,4 U/mg de proteína). El orden decreciente de actividad proteasa en cada muestra es el siguiente: 1B, 10V-11V, 5V, 9V, 6V, 2B, 3B, 4V-7V, 8V y 12V.

7. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

7.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Según la tabla 3 en la cual se observaron el bandeo proteico de los geles de 10%, la banda 10 se observó en 11 de las muestras, excepto en la muestra 9V, oscilando entre 33,21 KDa y 39,11 KD, lo cual sugiere que esta proteína puede ser la Zn- α 2-glicoproteína mayormente identificada en los quistes de mama (Celis y cols, 2008). En el rango de valores anteriormente citados, el peso molecular 38,25 KDa, apareció en las bandas 2B, 3B, 4V, 6V, 7V y 12V. Así mismo, la banda 6 también tiene alta frecuencia de aparición en 6 de las bandas (2B, 3B, 6V, 7V, 8V y 12V), fluctuando entre 62,68 KDa y 67,54 KDa, valores estos a través de los cuales se puede presumir la presencia de la proteína albumina cuyo peso molecular es 68 KDa (Bollag, Rizycky y Edelstein, 1996). Esta macromolécula fue identificada como componente de fluidos de quistes de mama en el estudio realizado por Gallego (2004). Debe mencionarse que el peso molecular 64,16 KDa estuvo presente en 3 de las bandas anteriormente mencionadas (2B, 3B Y 12V). Por otra parte la banda 13 estuvo presente en las muestras 2B, 3B, 4V, 6V, 7V, 8V y 12V.

En el patrón de bandeo del gel de resolución de 12,5% también se identificaron la Zn- α 2-glicoproteína y la Albúmina según las bandas 6 y 3, que fluctúan entre 30,72 KDa - 36,09 KDa y 63,89 KDa- 66,54 KDa, respectivamente. Estas bandas fueron las que presentaron mayor frecuencia de aparición en las muestras analizadas. De igual forma puede agregarse que la banda 9 apareció en las muestras 2B, 3B, 4V, 5V, 8V, 9V y 10V oscilando entre 12,60 KDa y 16,47 KDa valores aproximados al peso molecular de la lisozima (14,3 KDa) según, Bollag, Rizycky y Edelstein, (1996). Esta macromolécula fue identificada en fluidos de secreción tipo II asociados a cáncer de mama (Gallego, 2004).

Es importante mencionar que en el método de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, se observó en ambos geles de resolución (10% y 12,5%) que la muestra 5V es la que presenta mayor bandeo, observándose las bandas 1,2,3,4,7,9,10, y 12 en el gel de 10% y las bandas 1,3,4,5,7 y 9 en el gel de 12,5 %.

7.2 Espectrofotometría

De acuerdo con la tabla 5, la cola del pico de absorbancia de 260nm que permite determinar la presencia de ácidos nucleicos se solapa con la del pico de absorbancia de 280 nm (proteínas), produciendo un error sistemático el cual se ve reflejado en el porcentaje de contribución de ácidos nucleicos sacado de la tabla de Warburg y Christian (1941) según el cociente A_{280}/A_{260} . En tal sentido se observa que dicho porcentaje oscila entre 0.75% y 4.00%, valores considerados como bajos por ser menores que 5%. Por otra parte, al cuantificar la concentración de ácidos nucleicos (AN) expresada en mg/ml y comparar cada muestra se notó que los fluidos de los quistes de mama 1B y 5V presentan 0,3mg/ml (concentración más baja) y la muestra 12V alcanza un valor de 6.5 mg/ml, el cual representa la concentración más elevada de ácidos nucleicos entre todas las muestras. seguidamente, la muestra 12V es la que presenta mayor concentración de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos).

7.3 Actividad específica proteasa

En el desarrollo de esta técnica se realizaron varios ensayos para descarte de variables que influían en la técnica de geles de agarosa aplicada por Fuenmayor (2000). El buffer seleccionado fue el (1) y el sustrato la leche Karla con concentraciones de 0,31 g y 0,62 g. Para escoger el sustrato óptimo se aplicó el criterio de nitidez y homogeneidad de halos (ver figura 18). De igual manera se procedió a seleccionar el buffer (1) según el criterio inverso por representar un control negativo, el Ananase y la bromelina como controles positivos, por presentar formación de halo.

De acuerdo con la tabla 7 la muestra 11V (sin buffer) presentó mayor pureza enzimática y una concentración de proteínas intermedia (47 mg/ml). Así mismo la relación más fuerte de expresión molecular la presenta la muestra 1B con un cociente de 64 U.ml/mg² y la muestra 12V con menor expresión molecular. A su vez, cabe resaltar que esta última muestra fue la que presentó mayor cantidad de material genético dada la presencia de una concentración de ácidos nucleicos de 6,5 mg/ml. Debe reseñarse que las muestras 9V y 10V no presentaron actividad específica proteasa y en el siguiente ensayo, cuyos resultados se tabularon en la tabla 8, con presencia del buffer (1), se presume que el mismo activó dichas muestras porque perturbó su naturaleza, pudiendo mejorar su rendimiento enzimático ya que se registraron actividades específicas de 10,7 U/mg y 12,2 U/mg en las muestras 9V y 10V en esas condiciones.

De acuerdo con la tabla 9, al usar una concentración de sustrato de 0,62 g sin buffer, las unidades de enzima de la muestra 1B aumentaron al igual que su actividad específica proteasa, sin embargo, esto no ocurrió en todas las muestras. La 12V continuo presentando menor pureza (2.7 U/mg) y una expresión molecular dominada por la presencia de mayor material genético dada su concentración de ácidos nucleicos más elevada y del orden de 6,5 mg/ml.

No se observa actividad específica en las muestras 9V y 10V, no obstante en el ensayo del sustrato con 0,62 g de concentración y buffer (ver tabla 10), su actividad aumentó considerablemente en cantidades de 14,3 U/mg y 21,3U/mg.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

El presente estudio se enfocó en evaluar un posible perfil proteico y la actividad específica proteasa de fluidos de quiste de mama a través de los métodos analíticos anteriormente descritos para la obtención de los resultados.

Al respecto, los objetivos planteados fueron alcanzados ya que se aplicó el método de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida para identificar el contenido de las proteínas presentes de las muestras, obteniéndose 13 bandas proteicas en el gel de resolución de 10% y 9 bandas en el gel de 12,5%. Esto ocurre porque aquellas moléculas de mayor tamaño hallaron mayor resistencia al avanzar a través de los poros del gel, que aquellas moléculas pequeñas. Estos resultados sugieren que a menor concentración del gel de resolución, mayor será la migración electroforética de estas macromoléculas debido a que el poro de dicho gel es más grande, lo cual facilita el desplazamiento proteico en función de su tamaño o peso molecular. Cabe destacar que la técnica antes descrita permite verificar la calidad de la muestra, al presenciarse la corrida electroforética y el uso del SDS y β -mercaptoetanol como componente del buffer que no afecta su naturaleza, por otra parte las bandas obtenidas para cada uno de los geles de resolución a concentraciones de 10% y 12,5% constituyen un registro de los pesos moleculares de las proteínas presentes en las muestras, mediante el cual se puede establecer una comparación interna entre las corridas electroforéticas y también con estudios antes realizados en los cuales se tabulen pesos moleculares de proteínas conocidas.

Según las tablas 3 y 4 en las cuales se presentaron los patrones de bandeos, de los fluidos de quiste de mama, en la muestra 5V se observó mayor migración, la cual correspondió a las bandas 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 y 12, para el gel de resolución de 10% y de 6 bandas en el gel de 12,5% (1, 3, 4, 5, 7 y 9). De acuerdo

con la frecuencia de aparición de las bandas se identificaron las macromoléculas Zn- α 2-glicoproteína y Albumina en los dos geles de resolución, con pesos moleculares de 39 KDa y 68 KDa, que según Gallego, (2004), Celis y cols (2008) son grandes moléculas características de los fluidos de quiste de mama. Además, la corrida electroforética del gel de 12,5% permitió identificar a la lisozima (14,3 KDa) a través de la banda 9 que se repite en 7 de las muestras.

Así mismo, se logró la cuantificación de las proteínas totales empleando la técnica de espectrofotometría en la que se estimó la contribución de proteínas en el material biológico examinado, así como de ácidos nucleicos, puesto que el espectrofotómetro no separa completamente los picos de absorbancia a 260 nm y 280 nm, sino que los solapa y arrastra con ello un error sistemático e instrumental expresado a través del porcentaje de ácidos nucleicos en cada una de las muestras (%AN). Se arrojó un rango de concentración de proteínas entre 39 mg/ml y 186 mg/ml, así como de ácidos nucleicos que osciló desde 0,3 mg/ml hasta 6,5 mg/ml, siendo estas últimas cantidades moderadamente bajas, presumiéndose que a mayor concentración de los mismos en el fluido externo debe haber un mecanismo de expresión molecular genotípica que codifica a otro fenotípico. Esto quiere decir que los ácidos nucleicos constituyen material genético contenido en los fluidos examinados. De igual manera, se expresa que la muestra 12V fue la que presentó las mayores concentraciones de las macromoléculas antes citadas.

Lo dicho anteriormente, sugiere la presencia de las proteínas y ácidos nucleicos como macromoléculas que definen o representan a los fluidos de quistes de mama como entes biológicos.

Los resultados obtenidos de espectrofotometría sirvieron para determinar la actividad específica proteasa de algunas de las proteínas presentes en los fluidos de quistes de mama puesta en evidencia a través de placas de agarosa. Para ello se evaluó la técnica de actividad proteasa empleada por Fuenmayor (2000) en base al descarte de factores dependientes, tales como sustrato y su

concentración. Así como el buffer uno (1) óptimo los cuales estuvieron sujetos a control positivo (Ananase) así como el buffer 1 y el agua como controles negativos. La presencia de los halos y el criterio específico que los relacionó con los monitores de unidades de enzima por mililitro (U/ml), la cantidad enzimática (AE) expresada en unidades de enzima por miligramos (U/mg) y el cociente de la actividad específica proteasa entre la concentración de ácidos nucleicos, que nos da el índice de expresión molecular.

En tal sentido, se verificó que mientras más proteínas totales hay con respecto a las unidades de proteína, la proporción disminuye y con ello la importancia de la actividad proteasa. Así mismo, la relación inversa sugerirá la presencia de un tejido anormal. De igual forma, el cociente de la actividad enzimática en función de la concentración de ácidos nucleicos supone una expresión molecular de los fluidos representados genéticamente por los ácidos nucleicos a nivel genotípico y a nivel fenotípico, por las unidades de enzima y los miligramos de proteína. A través de este método se verificó el contenido proteico de las muestras y su actividad enzimática por efecto de una proteína con dicha actividad. La variación de las condiciones óptimas, es decir, la concentración de sustrato no tuvo efecto significativo sobre los resultados obtenidos. Ello obedece a que la enzima se satura y esta variación no afecta su actividad enzimática. Así pues, la muestra 12V es la que presenta menor actividad específica proteasa en los cuatro ensayos desarrollados. Por otra parte, se evidenció el efecto de la presencia de buffer sobre las muestras 9V y 10V, que fueron activadas por el mismo.

En líneas generales, los tres métodos analíticos empleados permitieron identificar las presencias de proteínas de los fluidos de quiste de mama. Igualmente, el estudio espectrofotométrico permitió calcular la actividad específica proteasa de las mismas, con lo cual se verificó la hipótesis planteada.

8.2. Recomendaciones

Una vez finalizada esta investigación se sugiere presentar los hallazgos obtenidos al grupo de profesionales de la ginecología que suministraron el material biológico extraído mediante previa aplicación de la técnica de punción aspiración con aguja fina (PAAF) a pacientes provenientes del Seguro social "Juan Montezuma Giannary" de la ciudad Valera-Edo.Trujillo. Con la finalidad de usar los resultados obtenidos como información para realizar una visión retrospectiva y prospectiva de la situación, emitiendo su pronóstico así mismo. Este reporte puede hacerse extensivo a la comunidad médica y al público en general, por ser libre de divulgación, guardando la identidad de los pacientes.

Ya que en la aplicación del método de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, se identificó la Lisozima en el gel de resolución de 12,5% y Gallego (2004) la caracterizó como polipéptido perteneciente a los fluidos de secreción tipo II que están relacionados significativamente con el cáncer de mama, es menester que los ginecólogos que atienden a las pacientes 2B, 3B, 4V, 5V, 8V, 9V y 10V hagan un seguimiento a estos casos con el fin de descartar patologías malignas a largo plazo.

Con respecto a esta misma técnica, este método representa un punto de partida para estudios posteriores en los cuales se realicen nuevos ensayos a las mismas pacientes para correlacionar los patrones de bandas, aplicando estadística inferencial mediante la T de Student, para establecer similitudes y diferencias entre los mismos.

Igualmente se sugiere utilizar la espectrofotometría como método de ensayo químico versátil para medir la actividad específica enzimática y el índice de expresión molecular, ya que la instrumentación básica es relativamente simple y de bajo costo. Tanto esos métodos, como el de estimación de proteasas, se podrían proponer para una transferencia de biotecnología de aplicación inmediata en un laboratorio especializado.

9. REFERENCIAS

- Arias, C., Paricio, J., y Revenga, F. (2000). *Adenomatosis erosiva del pezón*. 91:412-5.
- Bajo, J., Lailla, J. y Xercavines, J. (2009). *Fundamentos de Ginecología*. Madrid: Medica Panamerica S.A. 502.
- Baggins, M. (2009). *Atlas de Anatomía de la Pelvis y Cirugía Ginecológica*. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana S.A.
- Boccado, F., Valenti, G., Zanardi, S., Cernita, G., Passio, T., Bruzzi, P., De Francis, V., Barreca, A., Del Monte, P., y Minuto, F., (1988). *Epidermal Growth Factor in Breast Cyst Fluid: Relationship with Intracystic Cation and Androgen Conjugate Content*. Cancer Research. 48: 5860-5863.
- Bollag, D., Rizycky, M. y Edelstein, S (1996). *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss.
- Botella y Clavero (1993). *Tratado de Ginecología*. 14ª ed. Madrid: Díaz de Santos S.A.
- Boticario, C. y Cascales, M. (2008). *Crecimiento celular y cáncer*. Madrid: UNED.
- Cascales, M. y Álvarez, J. (2009). *Matriz extracelular y proteasas*. Anales de la Real Academia de Farmacia. 76 (1): 59-84.
- Celis, J., Gromov, P., Moreira, J., Cabezo, T., Friiz, E., y Gromova, I. (2008). *Apocrine Cyst of the Breast*. Molecular & Cellular Proteomics. 53: 562-483.

- Chang, R y College, W. (2002). Química. 7ª ed. México: Mc Graw Hill Internacional. 987-988.
- Cooper, G. (1984). Instrumentos y técnicas de bioquímica. Barcelona: Reverté S.A. p.p. 55-56, 213-218.
- De la Vega, M., Menéndez, P., Astudillo, A., y Sánchez, M. (2001). *Expresión inmunohistoquímica de apolipoproteína d en carcinoma de mama en mujeres menores de 50 años*. Extraído el 25 de Julio de 2012, de la página web: <http://conganat.uninet.edu/IVCVHAP/POSTER-E/080/R168.htm>.
- Duque y Rubio (2006). *Semiología Médica Integral*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Fernández, B. (2005). *Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos*. Tesis Doctoral. Universidad de Rovira. España.
- Fernández-Cid, A. López, L. (1983). *Citología ginecológica y mamaria*. Barcelona: Salvat.
- Fuenmayor, A. (2000). *Determinación del comportamiento de la actividad Ca-Proteína y de la actividad Cisteino proteasa de diferentes aislados en Tripanosoma cruzi y Tripanosoma rangeli cultivados en tres medios distintos*. Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes: Mérida-Venezuela. Postgrado en Química de Medicamentos.
- Gallego, G. (2004). *Nódulo palpable de mama*. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. vol.56. N°1. Bogotá.

- García, M. (2000). *Prevalencia de la infección por Helicobacter pylori en la población general adulta de la provincia de Ourense y estudio de factores de riesgo asociados*. España: Universidad Santiago de Compostela.
- González, K., y Márquez, E. (2011). *Evaluación preliminar del contenido proteico del fluido de quistes de mama*. Tesis de Grado. Universidad de Los Andes: Mérida-Venezuela. 76-79.
- Guyton, A., y Hall, J. (2006). *Compendio de Fisiología Médica*. 14^a ed. Madrid: Elsevier.
- Haagensen, C. (1971). *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Saunders.155-176.
- Jiménez, M., Vilaplana, E., y Nogales, F. (1985). *Citopatología Ginecológica*. Barcelona: Científico Médica. 481-490.
- Jordan, J., Galindo, M., Calvo, S., González, C. y Cena, V. (2000). *Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cell through superoxide production*. Br. J. Pharmacol. 130 (7): 1496-1507.
- Koolman, J. y Heinrich, K. (2004). *Bioquímica. Texto y Atlas*. Madrid: Médica Panamericana S.A.
- Latarjet, M. y Ruíz, A. (2004). *Anatomía Humana*. (4^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana S.A. 801-803.
- Maeda, Y., Tanaka, E., Fujiwara, M., Watanabe, R., Furusawa, H., Matsu, T., Nakahara, H., y Nanba, K. (2002). *Accumulation of 4- and 5-ene steroid sulfates in human breast cyst fluids*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 81:249-253.

- Mannello, F., Tonti, G., y Papa, S. (2006). *Human gross cyst breast disease and cystic fluid: bio-molecular, morphological, and clinical studies*. Breast Cancer Research and Treatment. 354: 677-678.
- Maldonado, A., Aljonada J., y Jorrín, N. (2008). *Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida*. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Edited by Foxit Reader. 1-12.
- Mayans y Martel (1999). *Control de calidad de la leche materna*. Arch. Arg. Ped. 97 (2); 109-115.
- Melo, V. y Cuamatzi, O. (2006). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. México: Reverté.
- Muñoz, F. (2002). *NUTRIWEB*. Extraído el 25 de Julio de 2012, de la página web: <http://www.aula21.net/Nutriweb/pagmarco.htm>.
- Murray, P. y Kobayaschi, G. (1997). *Microbiología Médica*. Madrid: Elsevier Science. 198-293.
- Ogalla, J., Giralt, E., y Novel, V. (2002). *Cirugía de partes blandas quistes*. Revista Española de Podología. XXI (6) : 225-22.
- Peña, A. (1988). *Bioquímica*. 2ª ed. México: Limusa.
- Riza, A., Sis, B., Canda, T., y Onvural, B. (2009). *Electrolytes and trace elements in human breast cyst fluid*. Biological trace Element Research. 128: 18-30.

Roa, Y. (2001) y Andrade, E. **Activadores e inhibidores orgánicos de cisteinoproteasas extraídos de la *Bromelia chrysantha* Jacq (Bromeliaceae).** Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Rosales, A. (2004). *Estudio de las proteasas presentes en el tracto digestivo de *Rhodnius prolixus**. Tesis de Grado. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Sánchez, L., López, O., y Bjorkman, P. (1997). *Electrolytes and trace elements in human breast cyst fluid*. Biological Trace Element Research. 94:4626-4630.

Stryer, L. (2002). *Bioquímica*. 5 ed. New York: W. H. Freeman.

Solomon, E. (2008). *Biología*. México: Mc Graw Hill Internacional. 65.

Soto, W. (2006). *El seno, prevención y cura del cáncer de mama*. Buenos Aires, Argentina: Del Nuevo Extremo. 64.

Tapia, F. (2007). *Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria*. 4^a ed. España: Vértice

Torres, A. y Zambrano, C. (2001). *Búsqueda de reguladores (inhibidores/activadores) de la actividad Cisteinoproteasa en fuentes naturales*. Trabajo de grado. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Tsung, J., Wang, T., y Yang, P. (2005). *Cytological and biochemical studies of breast cyst fluid*. The breast. 14: 37-41.

Ulrich, J. (2006). *Histología*. 2^a ed. Buenos Aires: Panamericana S.A. 570.

Uriburu, J. (1977) *La mama, estructura, patología, diagnóstico y tratamiento*. Tomo 1. 2ª ed. Buenos Aires. 221-235.

Voet, D. y Voet, J. *Bioquímica*. 3ª ed. Buenos Aires.

Vizoso, A., Martínez, J., Vázquez, M., Suárez, A., Rodil. J., y García M. (2000). *Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos*. Revista de Cirugía Española. vol.68. N° 5. 471-85.

Zavala, J. (2005). *Manual de técnicas Básicas de Biología Molecular*. México: Universidad autónoma de Yucatán.

www.bdigital.ula.ve

10. ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

ANEXO A. Curvas usadas como patrón para la estimación de los pesos moleculares de las muestras de quiste de mama sembradas en geles de acrilamida a concentraciones de 10% y 12,5%

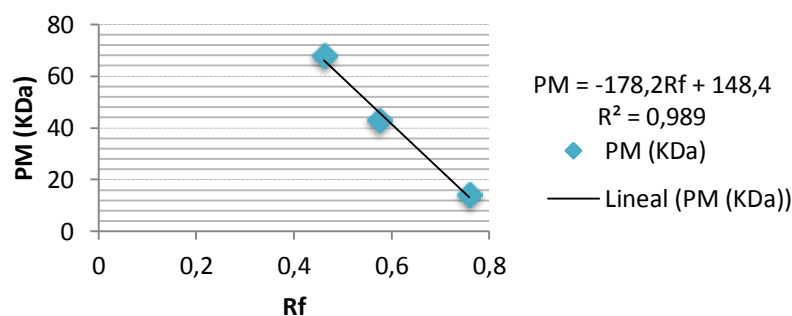
www.bdigital.ula.ve

Tabla 11. Marcadores de los pesos moleculares del gel A1 al 10%

Rf de los marcadores	PM (KDa)
0,462	68
0,574	43
0,759	14,3

Fuente: Elaboración propia (2014)

Gráfica 1. Curva de calibración de los pesos moleculares en función de Rf para el gel A1 al 10%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 12. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste de mama del gel A1

Muestra	Rf	PM (KDa) PM= -178,24x + 148,41
1	0,40	77,11
	0,50	59,29
	0,63	36,11
9	0,41	75,33
	0,65	32,55
	0,67	28,98
10	0,41	75,33
	0,50	59,29
	0,63	36,11
	0,76	12,94
11	0,50	59,29
	0,41	75,33
	0,56	48,59
	0,63	36,11

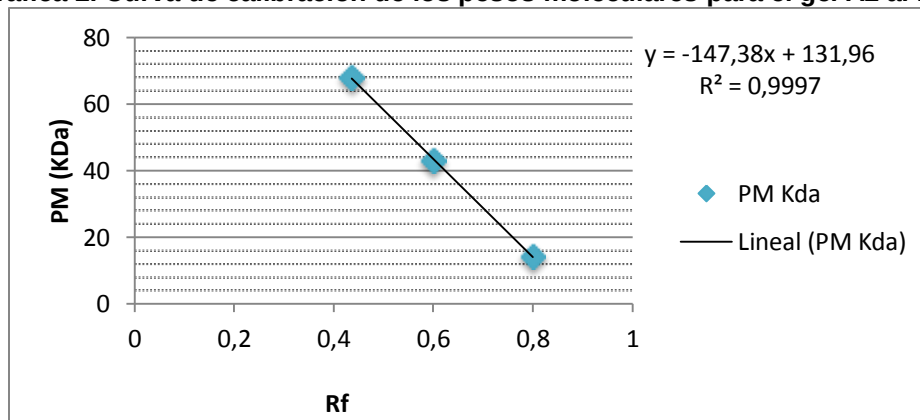
Fuente: elaboración propia (2014)

Tabla 13. Marcadores de los pesos moleculares del gel A2 al 10%

Rf de los marcadores	PM (KDa)
0,436	68
0,60	43
0,80	14,3

Fuente: Elaboración propia (2014)

Gráfica 2. Curva de calibración de los pesos moleculares para el gel A2 al 10%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 14. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste mama del gel A2

Muestra	Rf	PM Y: -147,38x + 131,96
12	0,46	64,16
	0,56	49,42
	0,69	30,26
8	0,46	64,16
	0,48	61,21
	0,56	49,42
	0,63	39,11
	0,67	33,21
5	0,10	117,22
	0,15	109,85
	0,24	96,58
	0,50	58,27
	0,59	45,00
	0,67	33,21
	0,76	19,95
2	0,46	64,16
	0,56	49,42
	0,69	30,26
3	0,46	64,16
	0,56	49,42
	0,69	3,26

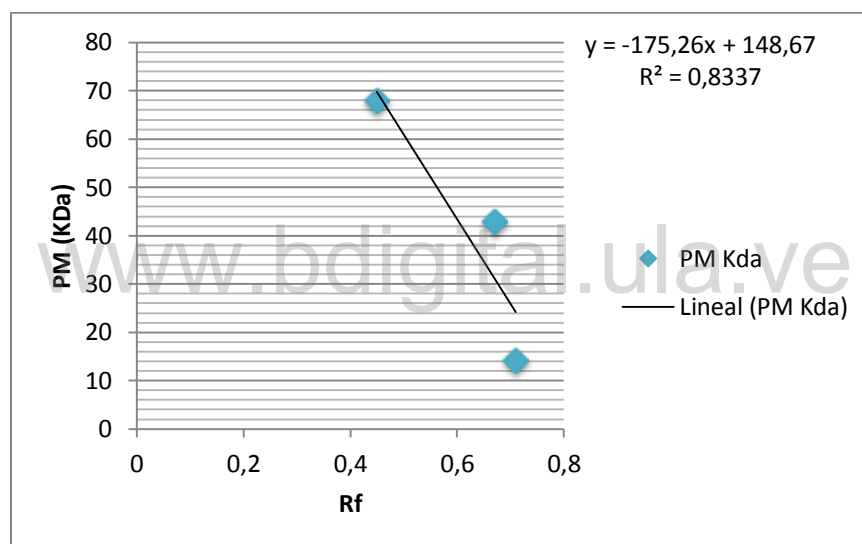
Fuente. Elaboración propia (2014)

Tabla 15. Marcadores de los pesos moleculares del gel A3

Rf de los marcadores	PM (KDa)
0,44	68
0,67	43
0,71	14,3

Fuente. Elaboración propia (2014)

Gráfica 3. Curva de calibración de los pesos moleculares para el gel A3 al 10%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 16. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste mama del gel A3.

Muestra	Rf	Y=PM Y: -175,26x + 148,67
8	0,40	78,56
	0,54	54,02
	0,63	38,25
	0,79	10,21
	0,81	6,70
12	0,52	57,53
	0,63	38,25
	0,79	10,21
	0,81	6,70
7	0,48	64,54
	0,63	38,25
	0,79	10,21
	0,81	6,70
6	0,48	64,54
	0,63	38,25
	0,79	10,21
	0,81	6,70
5	0,096	131,84
	0,19	115,37
	0,52	57,53
	0,62	40,00
	0,77	13,71
4	0,54	54,02
	0,63	38,25
	0,77	13,71
	0,81	6,70
2	0,63	38,25
	0,81	6,70
3	0,54	54,02
	0,63	38,25
	0,81	6,70

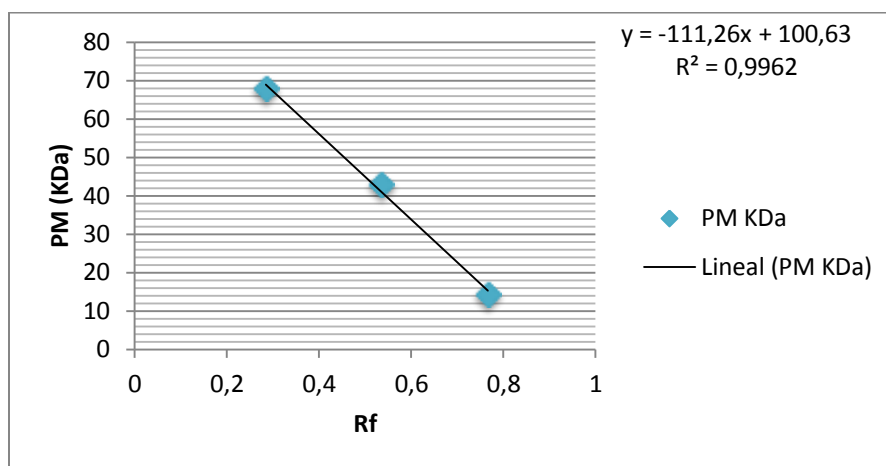
Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 17. Marcadores de los pesos moleculares del gel B1

Rf de los marcadores	PM(KDa)
0,285	68
0,535	43
0,767	14,3

Fuente: Elaboración propia (2014)

Grafica 4. Curva de calibración de los pesos moleculares para el gel B1 al 12,5%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 18. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste mama del gel B1.

Muestra	Rf	Y=PM Y: -111,26x + 100,63
1	0,33	63,91
	0,38	58,35
	0,60	33,87
	0,73	19,41
9	0,33	63,91
	0,38	58,35
	0,58	36,09
	0,75	17,18
10	0,33	63,91
	0,45	50,56
	0,58	36,09
	0,76	16,07
11	0,58	36,09
	0,73	19,41

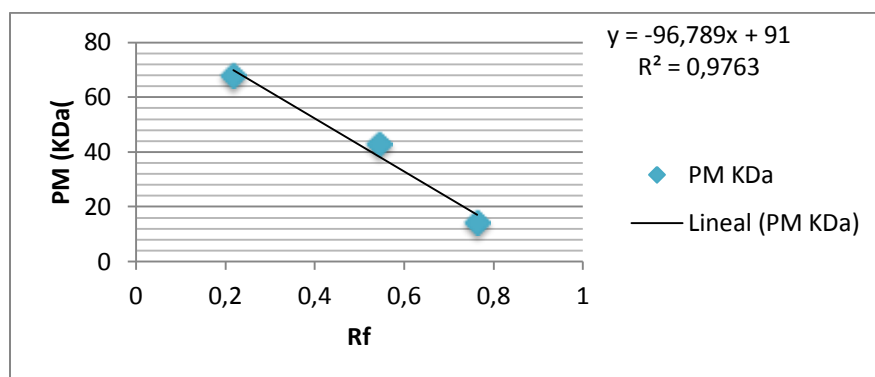
Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 19. Marcadores de los pesos moleculares del gel B2

Rf de los marcadores	PM (KDa)
0,218	68
0,545	43
0,763	14,3

Fuente: Elaboración propia (2014)

Grafica 5. Curva de calibración de los pesos moleculares para el gel B2 al 12,5%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 20. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste mama del gel B2.

Muestra	Rf	Y=PM Y: -96,789x + 91
12	0,36	56,15
	0,45	47,44
	0,70	23,24
	0,77	16,47
4	0,36	56,15
	0,45	47,44
	0,70	23,24
	0,77	16,47
8	0,23	68,73
	0,34	58,09
	0,45	47,44
	0,64	29,05
	0,79	14,53
5	0,10	81,32
	0,28	63,89
	0,38	54,22
	0,45	47,44
	0,64	29,05
	0,81	12,60
7	0,34	58,0
	0,47	45,50
	0,55	37,76
	0,77	16,47
3	0,34	58,09
	0,43	49,38
	0,70	23,24
	0,79	14,53
2	0,34	58,09
	0,45	47,44
	0,70	23,24
	0,79	14,53

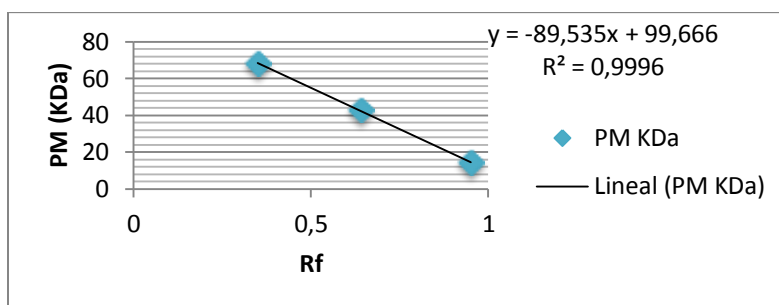
Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 21. Marcadores de los pesos moleculares del gel B3.

Rf de los marcadores	PM (KDa)
0,35	68
0,64	43
0,95	14,3

Fuente: elaboración propia (2014)

Grafica 6. Curva de calibración de los pesos moleculares para el gel B3 al 12,5%



Fuente: Elaboración propia (2014)

Tabla 22. Rf y pesos moleculares de las muestras de quiste mama del gel B3.

Muestra	Rf	Y=PM Y: -89,535x+ 99,669
3	0,39	64,75
	0,50	54,90
	0,81	27,14
	0,91	18,19
2	0,39	64,75
	0,50	54,90
	0,81	27,14
	0,91	18,19
12	0,39	64,75
	0,50	54,90
	0,81	27,14
	0,91	18,19
7	0,37	66,54
	0,52	53,11
	0,75	32,51
	0,83	25,35
	0,89	19,98
6	0,37	66,54
	0,52	53,11
	0,77	30,72
	0,91	18,19
8	0,29	73,70
	0,43	61,16
	0,52	53,11
	0,77	30,72
	0,91	18,18

Fuente: Elaboración propia (2014)

**ANEXO B. Tabla para la determinación de concentraciones de
proteínas y ácidos nucleicos por Warburg y Christian (1941)**

Tabla 23. Tabla para determinar las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos por Warburg y Christian (1941)

A280/A260	Correction factor	Nucleic Acid (in %)	A280/A260	Correction factor	Nucleic Acid (in %)
1.75	1.12	0	0.85	0.66	5.50
1.63	1.08	0.25	0.82	0.63	6.00
1.52	1.05	0.50	0.80	0.61	6.50
1.40	1.02	0.75	0.78	0.59	7.00
1.36	0.99	1.00	0.77	0.57	7.50
1.30	0.97	1.25	0.75	0.55	8.00
1.25	0.94	1.50	0.73	0.51	9.00
1.16	0.90	2.00	0.71	0.48	10.00
1.09	0.85	3.00	0.67	0.42	12.00
1.03	0.81	3.50	0.64	0.38	14.00
0.98	0.78	3.50	0.62	0.32	17.00
0.94	0.74	4.00	0.60	0.29	20.00
0.87	0.68	5.00			

Fuente: Warburg y Christian (1941)

ANEXO C. Ensayos donde se evidencia la presencia de halos turbios

y claros

www.bdigital.ula.ve

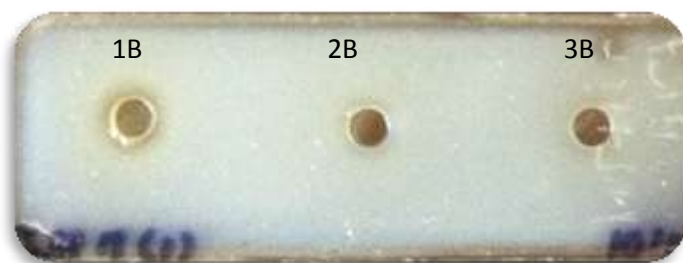


Figura 22. Actividad proteasa, muestras 1B, 2B, y 3B. Concentración [0,31 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)



Figura 23. Actividad proteasa, muestras 4V, 5V y 6V. Concentración [0,31 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

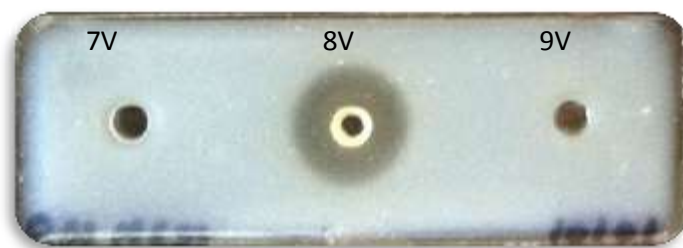


Figura 24. Actividad proteasa, muestras 7V, 8V y 9V. Concentración [0,31 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

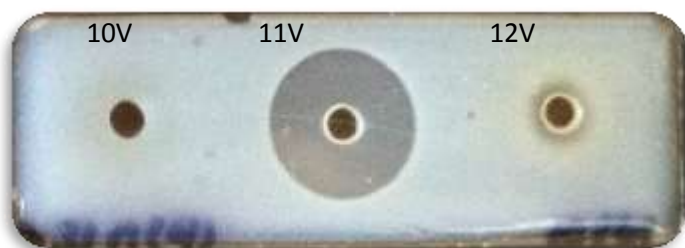


Figura 25. Actividad proteasa, muestras 10V, 11V y 12V. Concentración [0,31 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

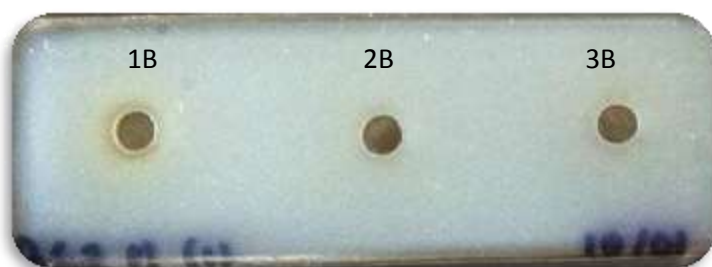


Figura 26. Actividad proteasa, muestras 1B, 2B y 3B. Concentración [0,62 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

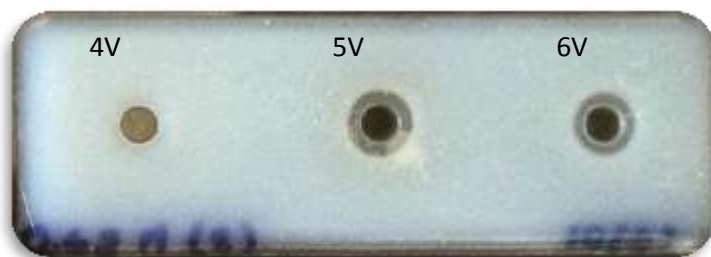


Figura 27. Actividad proteasa, muestras 4V, 5V y 6V. Concentración [0,62 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

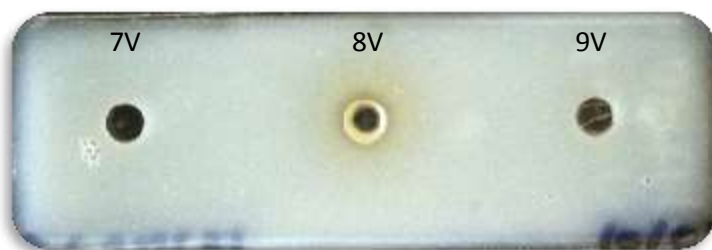


Figura 28. Actividad proteasa, muestras 7V, 8V y 9V. Concentración [0,62 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)



Figura 29. Actividad proteasa, muestras 10V, 11V y 12V. Concentración [0,62 g] sin buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

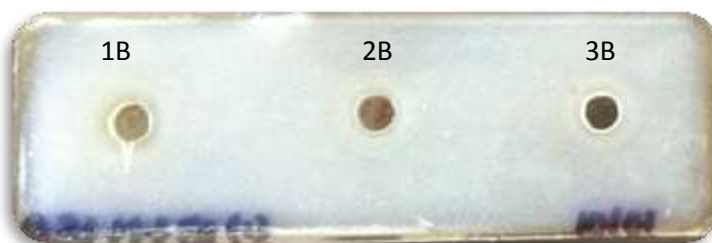


Figura 30. Actividad proteasa, muestras 1B, 2B y 3B. Concentración [0,31g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

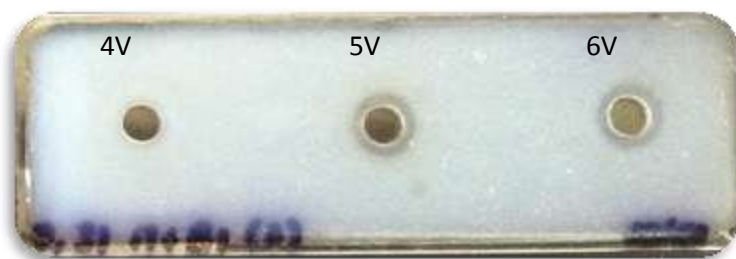


Figura 31. Actividad proteasa, muestras 4V, 5V y 6V. Concentración [0,31g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

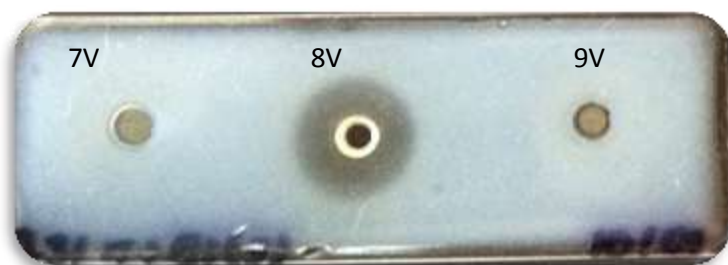


Figura 32. Actividad proteasa, muestras 7V, 8V y 9V. Concentración [0,31g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

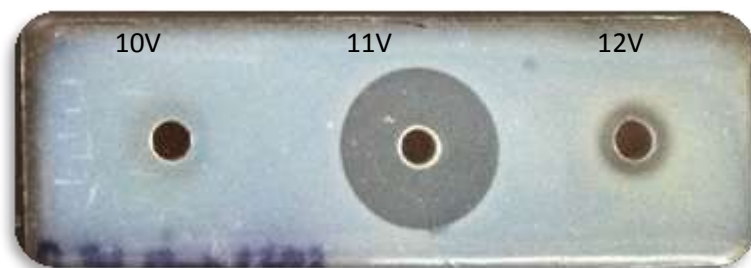


Figura 33. Actividad proteasa, muestras 10V, 11V y 12V. Concentración [0,31g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

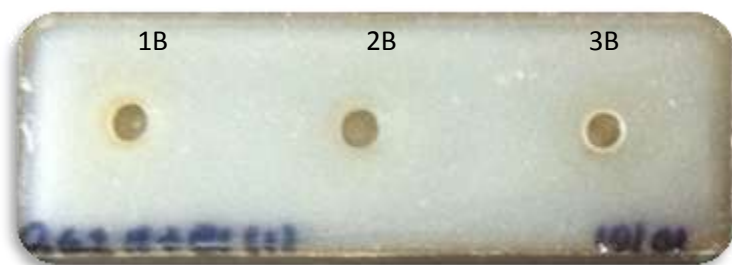


Figura 34. Actividad proteasa, muestras 1B, 2B y 3B. Concentración [0,62g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

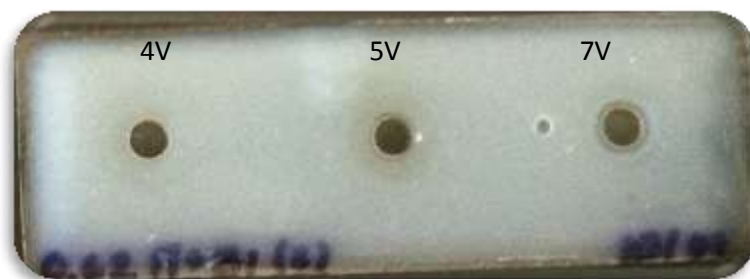


Figura 35. Actividad proteasa, muestras 4V, 5V y 6V. Concentración [0,62g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

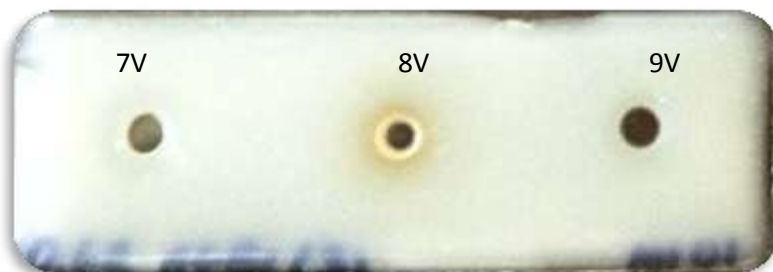


Figura 36. Actividad proteasa, muestras 7V, 8V y 9V. Concentración [0,62g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

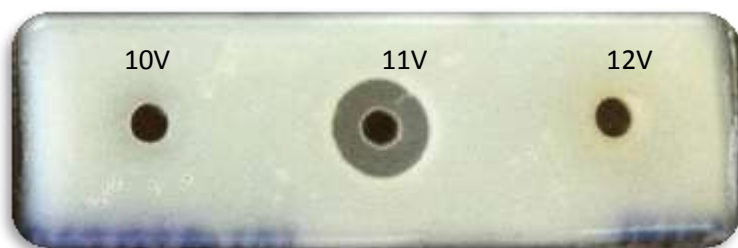


Figura 37. Actividad proteasa, muestras 10V, 11V y 12V. Concentración [0,62g] con buffer

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)



Figura 38. Controles del ensayo de actividad proteasa

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)

ANEXO D. Aportes del estudio

www.bdigital.ula.ve

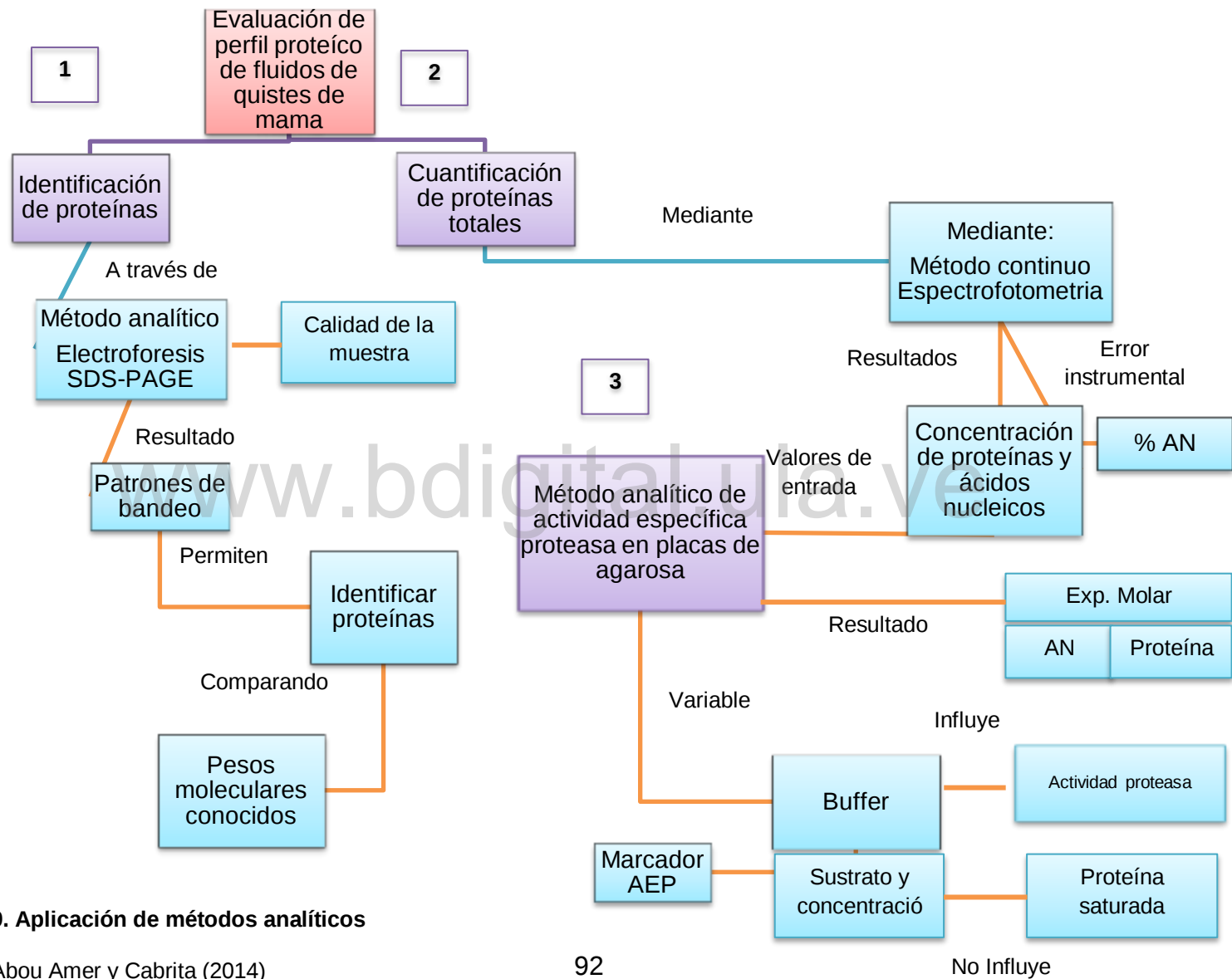
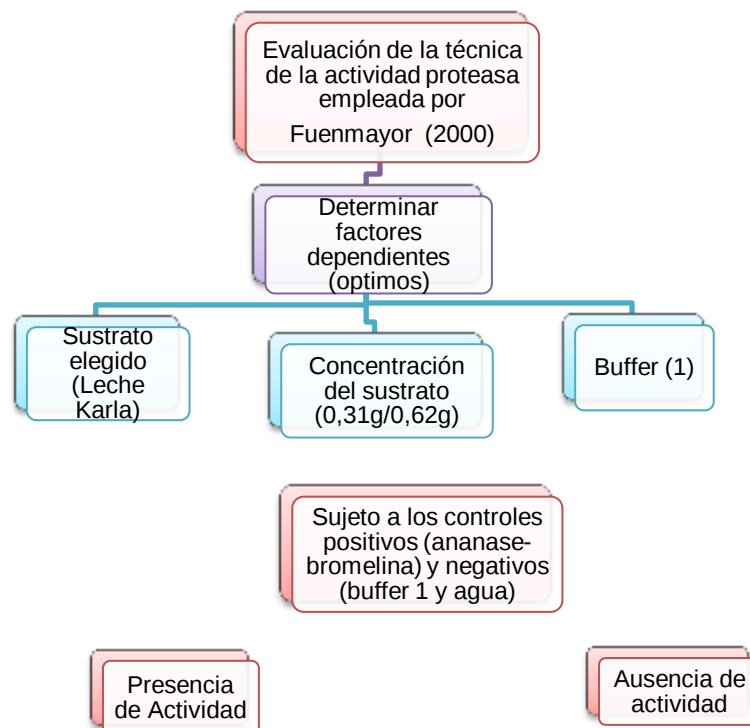


Figura 39. Aplicación de métodos analíticos

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)



www.bdigital.ula.ve

Figura 40. Método de actividad específica proteasa por descarte de variables.

Fuente: Abou Amer y Cabrita (2014)