



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA
RECOMBINANTE 3-AS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

ALFONSO ALI ALTAMIRANO VALENCIA

**Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
DIRECTOR DE TESIS**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	1
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	4
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
METODOLOGÍA	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
CONCLUSIÓN	14
BIBLIOGRAFÍA	15
ANEXO (Figuras)	18

ANTECEDENTES

Los órganos dentales están compuestos por cuatro tejidos mineralizados: esmalte, dentina, hueso alveolar y cemento radicular. Estos tejidos se diferencian a partir de una constante interacción epitelio-mesénquima y cada uno de estos tejidos está constituido por sales de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita (HA), que son depositados en la matriz extracelular (MEC) por proteínas específicas que son secretadas por las células que conforman dichos tejidos: ameloblastos, odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos¹.

Esta investigación se enfocó en el cemento radicular, que es un tejido mineralizado que cubre la superficie radicular del órgano dentario. Las principales funciones del cemento radicular son: proveer el anclaje para las fibras de colágena del ligamento periodontal, mediar la inserción del diente a hueso alveolar, distribuir las fuerzas masticatorias y jugar un papel primordial en la reparación de la superficie radicular. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la cementogénesis durante el desarrollo, la vida adulta y en los procesos regenerativos. Se propone que las células progenitoras del cemento radicular, provienen de zonas paravasculares del ligamento periodontal y de los espacios endosteales del hueso alveolar, sin embargo, no se han identificado los factores que regulan su reclutamiento y diferenciación. Es por esto, que el cemento radicular adquiere una importancia clave para el desarrollo de una terapia exitosa para lograr la regeneración y una nueva inserción del tejido conectivo periodontal.

Así mismo, el cemento radicular se asume que es parecido al hueso, porque presenta similitudes con este: 1) las enfermedades que afectan las propiedades del hueso a menudo alteran las propiedades del

cemento radicular, por ejemplo, la enfermedad de Paget resulta en hipercementosis; la hipofosfatasa resulta en la no-formación de cemento, con la exfoliación dentaria y el hipopituitarismo se asocia con la disminución de cemento²; 2) la composición inorgánica del cemento radicular es similar a la del hueso alveolar. Tanto el cemento como el hueso se componen aproximadamente del 50% de fosfatos de calcio que se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$; 3) la matriz orgánica del cemento es considerada similar al hueso: consiste primariamente en colágenas Tipo I (95%) y Tipo III (5%), las cuales en conjunto desempeñan un papel de tipo estructural. Moléculas como fibronectina (FN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC), osteonectina (SPARC) y diversos factores de crecimiento como IGF-I, IGF-II, FGFa, FGFb, PDGF y TGFβ, son también componentes de la matriz extracelular del cemento pero no son cemento-específicas^{3, 4}. Así mismo, la matriz orgánica de cemento presenta dermatán sulfato, hialuronato y condroitin sulfato que han sido identificados bioquímica e histoquímicamente como las especies dominantes^{5, 6}.

A pesar de estas similitudes, el cemento radicular tiene características únicas que lo pueden diferenciar de hueso: presenta un color amarillo, una baja microdureza, un recambio metabólico bajo, carece de inervación, de irrigación sanguínea directa, drenaje linfático, no sufre procesos de remodelación, presenta una formación activa caracterizada por un depósito continuo durante toda la vida, que se observa a manera de líneas de crecimiento; y posee hasta el momento moléculas específicas de matriz como la proteína de adhesión de cemento (CAP), la proteína de cemento (CP-23) y el factor de crecimiento de cemento (CGF), que se ha reportado ser similar al factor

de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), que le dan su característica de ser considerado un tejido único⁷⁻⁹.

Sin embargo, el proceso de determinación, diferenciación y formación de la matriz extracelular durante el inicio de la formación radicular del órgano dentario no es conocido a la fecha. Asimismo, los factores que disparan la proliferación de los precursores de los cementoblastos (células que secretan la matriz del cemento radicular); los que controlan su migración hacia la superficie radicular; y los que regulan su diferenciación, permanecen como preguntas abiertas. Para solucionar este problema es necesario el entendimiento de los mecanismos moleculares incluidos en la formación radicular, por ello se reconoce como paso esencial aislar y estudiar moléculas específicas que jueguen un papel importante en la diferenciación celular durante la morfogénesis del cemento radicular.

A este respecto en nuestro laboratorio se han aislado, clonado y caracterizado parcialmente varios genes llamados CP-23, CP-34 y 3-AS, a partir de una biblioteca de cDNA de una línea celular derivada de un cementoblastoma de humano, utilizando un anticuerpo policlonal contra una proteína derivada del cemento radicular (CP). De estas clonas la tesis se enfocó en purificar la proteína que codifica el gen 3-AS.

Resultados preliminares sugieren que el gen 3-AS presenta un cDNA ~586 pares de bases (pb) cuya predicción y análisis de su secuencia primaria al utilizar las bases de datos BLATS y GenBank, determinó que contiene un marco abierto de lectura (~507 pb) que codifica para una nueva proteína de ~168 aminoácidos, con una homología en sus secuencias parciales a la proteína colágena tipo I. La identificación y el aislamiento del gen 3-AS ofrecen por primera vez la

oportunidad de contribuir a la futura identificación y caracterización del linaje cementoblástico y de manera importante poder determinar los mecanismos celulares y moleculares que regulan el desarrollo radicular durante la cementogénesis en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado con características físico-químicas y estructurales bien conocidas que han sido descritas a detalle a nivel morfológico. Aunque se han realizado progresos acerca del aislamiento y propagación de líneas celulares que expresan el fenotipo del cemento radicular, el conocimiento específico acerca del origen del linaje cementoblástico, y los mecanismos celulares y moleculares que controlan el proceso de la cementogénesis, aún es muy limitado a la fecha. Una de las principales causas ha sido la falta de marcadores moleculares específicos para el fenotipo cementoblástico. Por ello, el aislamiento y caracterización de moléculas que sirvan de marcadores moleculares para el fenotipo cementoblástico abre la oportunidad de determinar en un futuro la localización de las células progenitoras y/o entender la biología del cemento radicular. Por lo que proponemos investigar en esta tesis; si el sistema ortólogo eucarionte permitirá la expresión del gen que codifica para la proteína 3-AS y si este sistema permitirá obtener a la proteína 3-AS modificada.

Al responder esta pregunta con nuestra investigación obtendremos resultados que ayuden a dilucidar en un futuro el posible papel de la proteína 3-AS en la biología del cemento radicular.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar y purificar la proteína que codifica el gen 3-AS expresada en un sistema ortólogo eucarionte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expresar en células de *Drosophila melanogaster* (sistema eucarionte) la proteína 3-AS.
- Determinar el peso molecular de la proteína 3-AS por geles de poliacrilamida.
- Purificar la proteína recombinante 3-AS por métodos de cromatografía de afinidad a Níquel.

HIPÓTESIS

- El gen 3-AS codifica para una proteína recombinante en sistemas ortólogos eucariontes (células de insecto *Drosophila melanogaster*)

METODOLOGÍA

Construcción del cDNA en plásmido de expresión eucarionte

El cDNA que codifica para la proteína 3-AS se clonó en un vector de entrada pENTR/D-TOPO para garantizar su direccionalidad en marco de lectura y posteriormente se llevó a cabo una recombinación con el vector de expresión pMT-DEST-48 para su posterior expresión en células de insecto utilizando la enzima clonasa LR-CLON siguiendo las instrucciones del fabricante Gateway technology (Invitrogen). El plásmido resultante fue transfectado a las células de insecto por el método de transfección por calcio junto con un plásmido de resistencia pCoHygro. Las células transfectadas se mantuvieron en selección con el antibiótico hygromicina por dos semanas y pasado ese tiempo se llevó a cabo la inducción con sulfato de cobre para que las células empezaran a producir la proteína recombinante. El vector pMT-DEST-48 contiene una región codificante para un epítotope V5 y para una cola de histidinas (6xHis-Tag) en el carboxilo terminal que permitió la inmunodetección de la proteína recombinante así como su purificación por cromatografía de afinidad por Níquel.

Cromatografía de Níquel

El medio concentrado donde se encuentra la proteína recombinante 3-AS, se llevo a 5 mililitros con una solución de 10 mM de Imidazole en buffer de fosfatos pH 7.4. Esta solución de la proteína recombinante 3-AS se pasó a través de una columna de afinidad que tiene en su interior sulfato de Níquel a una concentración de 0.1 M, repitiendo el paso a través de la columna de Níquel por lo menos 5 veces. Posteriormente se lavó la columna solución de 10 mM de

Imidazole para retirar la unión de proteínas inespecíficas que se encontraron en el medio de cultivo. Para obtener la fracción purificada de la proteína recombinante 3-AS se eluyó con una solución de 100 mM de Imidazole en buffer de fosfato pH 7.4. Esta fracción se concentró y se utilizó para realizar geles de proliacrilamida SDS-PAGE y detección por inmunotransferencias.

Electroforesis en geles de SDS-PAGE

Los geles en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE fueron realizados para los diferentes procedimientos de identificación de la proteína recombinante 3-AS. Los geles se prepararon al 12% de acrilamida y serán corridos a 100 V por 45 minutos. Los geles serán teñidos con la solución de azul de Coomasie para observar la banda de la proteína recombinante.

Inmunotransferencia

El gel de electroforesis con la proteína recombinante 3-AS fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Gibco, BRL) en una cámara de inmunotransferencia (BIORAD) a 63 V por 2 h., la transferencia se confirmó teñiendo la membrana con solución de Ponceau S. Posteriormente la membrana será bloqueada con BSA al 5% por 1h en agitación a temperatura ambiente. La membrana se incubará con cada uno de los anticuerpo primarios anti-His, anti-V5, diluidos a una concentración 1:500 e incubados a 4°C toda la noche. La membrana fue lavada con PBS-Tween 20 al 0.3% e incubada con el anticuerpo secundario cabra anti ratón, peroxidados a diluciones 1:1000 por 1h. Las inmunotransferencias se revelaron por quimioluminiscencia.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis indican que los análisis teóricos del gen 3-AS codifica para una proteína de ~168 aminoácidos en su secuencia primaria. La predicción teórica de la secuencia de aminoácidos usando los programas *PROSITE* y *ExpASy* reveló una proteína novel con un peso molecular de 17.76 kDa, presentando un punto isoeléctrico alcalino de 11.64 y con posibles modificaciones post-traduccionales como 17 sitios probables de presentar *fosforilaciones* (en los aminoácidos Treoninas posiciones 64, 87, 122, 144 y Serinas posiciones 42, 60, 74, 75, 84, 91, 92, 114, 115, 124, 132, 156, 167), 11 sitios probables de *O-glicosilaciones* (en los aminoácidos Treoninas posiciones 29, 32, 117, 122, 136, 144, 148, 152 y Serinas posiciones 124, 132, 138) y 3 sitios de *C-manosilación* (en los aminoácidos triptófanos posiciones 18, 54, 77). Estas modificaciones post-traduccionales, en especial las posibles fosforilaciones, nos podrían incrementar el carácter ácido de la proteína. Por otro lado, utilizando el programa *BLAST* para analizar la secuencia de la proteína 3AS, no mostró homologías con las proteínas presentes en las bases de datos, sin embargo encontramos una identidad del 33% con la colágena tipo I.

Los anteriores datos teóricos se confirmaron primero al lograr clonar en el vector pMT-Dest48/Bip/His-V5 el gen que codifica para la proteína 3-AS obteniendo el vector pMT-Dest48/Bip/His-V5+3AS.

Con el anterior vector se logró la transfección de las células de insecto (*Drosophila melanogaster*). Una vez transfectadas las células de insecto estas pueden ser sensibles de llevar a cabo el procesamiento de la proteína 3-AS, debido a que el vector presenta un promotor sensible de ser estimulado con sulfato de cobre. Al estar presente el sulfato de

cobre en el medio de cultivo de las células de insecto, se dice que las células están siendo estimuladas para expresar el gen que codifica para la proteína 3-AS. Estos resultados confirman otros estudios donde llevan a cabo la transfección de genes en sistemas eucariontes, en especial de insecto, donde mencionan su facilidad y factibilidad en obtener una expresión estable y con modificaciones post-traduccionales.¹⁴⁻¹⁷

La transfección y la expresión del gen 3-AS en las células de insecto se comprobaron con un análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce a la colita de 6-Histidinas que le adiciona el vector a la proteína cuando esta siendo procesada por las células de insecto. El anticuerpo *anti-His* va acoplado a un fluorocromo (FITC) que permite visualizar a las células que están expresando a la proteína de color verde. La inmunofluorescencia como se puede observar en la figura 1A, tiñe positivamente las células de insecto cuando fueron sometidas a inducción con sulfato de cobre, lo cual nos indica que están expresando la proteína 3-AS cuando se comparan con las células de insecto control (Figura 1B), las cuales fueron transfectadas con el vector vacío y sometidas a expresión con sulfato de cobre. Esto confirma que las células de insecto transfectadas con el vector pMT-Dest48/Bip/His-V5+3AS se incorporó al genoma de las células y lleva con éxito la producción de la proteína 3-AS en el sistema ortólogo eucarionte. Asimismo para garantizar que la proteína 3-AS se este expresando satisfactoriamente en el sistema de células de insecto, aislamos el ARN mensajero cuando las células llevaban 3 días de inducción con sulfato de cobre. El aislamiento del ARN mensajero de la proteína 3-AS fue amplificado a ADN por medio de la técnica de RT-PCR, la cual permite corroborar que la expresión del gen que codifica para la proteína 3-AS se encuentra incorporada al genoma de las células de insecto y estar expresando establemente como se observa en la figura 1C. Las células

control transfectadas con el vector vacío, no muestran amplificación del mensajero que codifica para proteína 3-AS.

Una vez comprobada la expresión de la proteína 3-AS en el sistema eucarionte, nos dimos a la tarea de llevar a cabo la determinación de la localización de la proteína 3-AS. Debido a que el vector que se utilizó en la transfección de las células de insecto produce una proteína con un péptido señal, esto ayuda a garantizar que la proteína sea secretada al medio de cultivo. Para obtener la proteína 3-AS purificada del medio, lo primero que se realizó fue concentrar el medio por centrifugación utilizando tubos centripep a 5500 rpm durante tres días a 4°C. Pasado este tiempo, la proteína concentrada fue lavada con PBS frío y centrifugada nuevamente durante 6 horas a 5500 rpm. Posteriormente, la proteína 3-AS fue sometida a purificación por cromatografía de afinidad a Níquel. La proteína recombinante purificada por níquel se sometió a geles de poliacrilamida de SDS-PAGE al 12% con la finalidad de determinar su peso molecular.

La proteína recombinante 3-AS mostró tener 2 especies prominentes, las cuales pueden ser visualizadas en geles de poliacrilamida cuando son teñidos con azul de Coomasie (Figura 2). Para confirmar estos datos, llevamos a cabo inmunotransferencias. Las inmunotransferencias nos indican que existen dos especies prominentes de proteínas recombinantes 3-AS. Estas especies son reconocidas al utilizar anticuerpos específicos contra los epítopes que le adiciona el vector a la proteína: el epítipo V5 fue reconocido con el anticuerpo policlonal anti-V5 y el epítipo de colitas de 6 histidinas por el anticuerpo monoclonal anti-His. Como se observa en la figura 3, los anticuerpos reconocen específicamente a la proteína recombinante 3-AS. El peso molecular determinado de la proteína recombinante 3-AS es de ~22 kDa

y ~35 kDa. Estas diferencias de peso puede deberse a las diferencias en las modificaciones post-traduccionales de la proteína a las que esta siendo sometida, las modificaciones como fosforilaciones, glicosilaciones, manosilaciones pueden afectar el tamaño de la molécula y darnos pesos moleculares diferentes. Estos datos se pueden confirmar debido a que diferentes moléculas expresadas en el sistema de células de insecto, reportan que han logrado aislar y purificar proteínas como el receptor a glucagon de humano, plasminógeno de humano, proteínas virales HIV- β gp120, péptidos de anticuerpos como la cadena simple del fragmento variable scFv, interleucinas y oncogenes como H-ras, con diferentes grados de modificaciones post-traduccionales y los cuales son importantes para estudiar como se afectan sus propiedades biológicas de las moléculas.¹⁸⁻²⁰ El haber obtenido proteínas recombinantes con diferentes pesos moleculares nos podría indicar en un futuro cuales son sus posibles implicaciones en la respuesta biológica cuando se realicen estudios de respuesta celular en cultivos *in vitro*.

CONCLUSIONES

El sistema ortólogo de *Drosophila melanogaster* permitió la expresión del gen que codifica para la proteína 3-AS.

Este sistema de *Drosophila melanogaster* permitió obtener grandes cantidades de proteína recombinante 3-AS en comparación con otros sistemas.

Las células de *Drosophila melanogaster* son un sistema ortólogo factible para obtener proteínas recombinantes 3-AS con posibles modificaciones post-traduccionales.

La proteína recombinante 3-AS se logró aislar y purificar del medio de cultivo mostrando dos especies prominentes.

En este trabajo se expresó y se purificó esta proteína que en estudios posteriores podrá ser significativa para el entendimiento del funcionamiento de células del linaje cementoblástico, ayudando así a futuras terapias de regeneración tisular guiada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zeichner-David, M., Diekwisch, T., Fincham, A., Lau, E., MacDougall, M., Moradian-Oldak, J., Simmer, J., Snead, M. & Slavkin, H. C. (1995) *Int. J. Dev. Biol.* 39:69–92
2. Linde, A. & Goldberg, M. (1993) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:679–728
3. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS (1994) Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res* 29:81-94
4. Paynter KJ, Pudy G (1958) A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 131:233-251
5. Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RC (1977) Proteins of the periodontum. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Int* 23:39-44
6. Chovelon A, Carmichael DJ, Pearson CH (1975) The composition of the organic matrix of bovine cementum. *Arch Oral Biol* 20:537-541
7. Christner P, Robinson P, Clarck CC (1977) A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int* 23:147-150.
8. Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW (1992) The role of osteonectin in human tooth development: An immunohistological study. *Calc Tissue Int* 50:468-472
9. Bronckers ALJJ, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT (1994) Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in rat. *J Bone Miner Res* 9:833-841
10. Arzate H, Chimal MJ, Hernández LL, Díaz LL (1996) Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodont Res* 31:144-148

11. Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chavez A, Reyes-Gasga J, Ximenez-Fyvie LA (2000) Electrón microscopy, micro-analysis and Xray diffraction characterization of mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res* 79:28-34.
12. Arzate H, Ximénez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S (2002) Immunolocalization of human cementoblastoma conditioned médium-derived protein. *J Dent Res* 81:541-546.
13. Alvarez-Pérez MA, Pitaru S, Alvarez-Fregoso O, Reyes-Gasga J and Arzate H (2003) Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 143:1-13
14. Arkhipova IR and Ilyin YV (1991) Properties of promoter regions of mdg1 Drosophila retrotransposon indicate that it belongs to specific class of promoter. *EMBO J* 10:1169-1177
15. Bunch TA, Grinblat Y and Goldstein LS (1988) Characterization and use of Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster. *Nucleic Acids Res* 16:1043-1061
16. Contursi C, Minchiotti G and Nocera PPd (1995) identification of sequences which regulated the expression of Drosophila melanogaster. *J Biol Chem* 270:26570-26576
17. Han K (1996) An efficient DDAB-mediated transfection of Drosophila S2 cells. *Nucleic Acids Res* 24:4362-4363
18. Tota MR, Xu L, Sirotina A, Strader CD and Graziano MP (1995) Interaction of fluorescein Trp25 glucagon with human glucagon receptor expressed in Drosophila Schenider 2 cells. *J Biol Chem* 270:26466-26472

19. Nilsen SL and Castellino FJ (1999) Expression of human plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 cells. *Protein Exp Purification* 16:136-143

20. Culp JS, Johansen H, Hellmig B, Beck J, Matthews TJ, Delers A and Rosenberg M (1991) Regulated expression allows high level production and secretion of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schenider cells. *Bio/Technology* 9:173-177

ANEXO

Figuras de la expresión de proteína 3-AS

Expresión de la proteína 3AS en células *Drosophila Melanogaster*

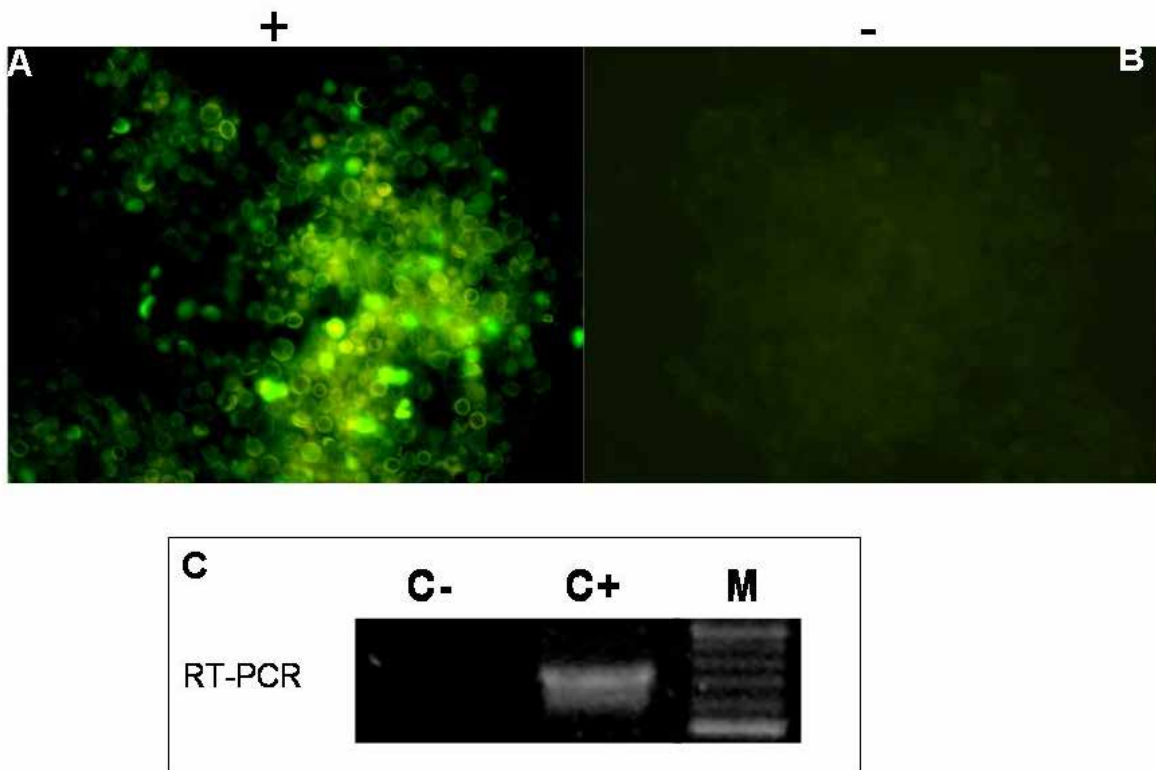


Figura 1. (A) Inmunofluorescencia de la transfección estable del gen que codifica para la proteína 3-AS en células de *Drosophila* Schneider S2 con el anticuerpo anti-His/FITC. (B) Inmunofluorescencia de la transfección del vector vacío en células de *Drosophila* Schneider S2 con el anticuerpo anti-His/FITC que sirvieron como control (-). (C) Reacción de transcriptasa reversa (RT-PCR) del mensajero aislado de las células de *Drosophila* Schneider S2 transfectadas con el vector que llevan la secuencia del gen que codifica para la proteína 3-AS (+) y con el vector vacío (-).

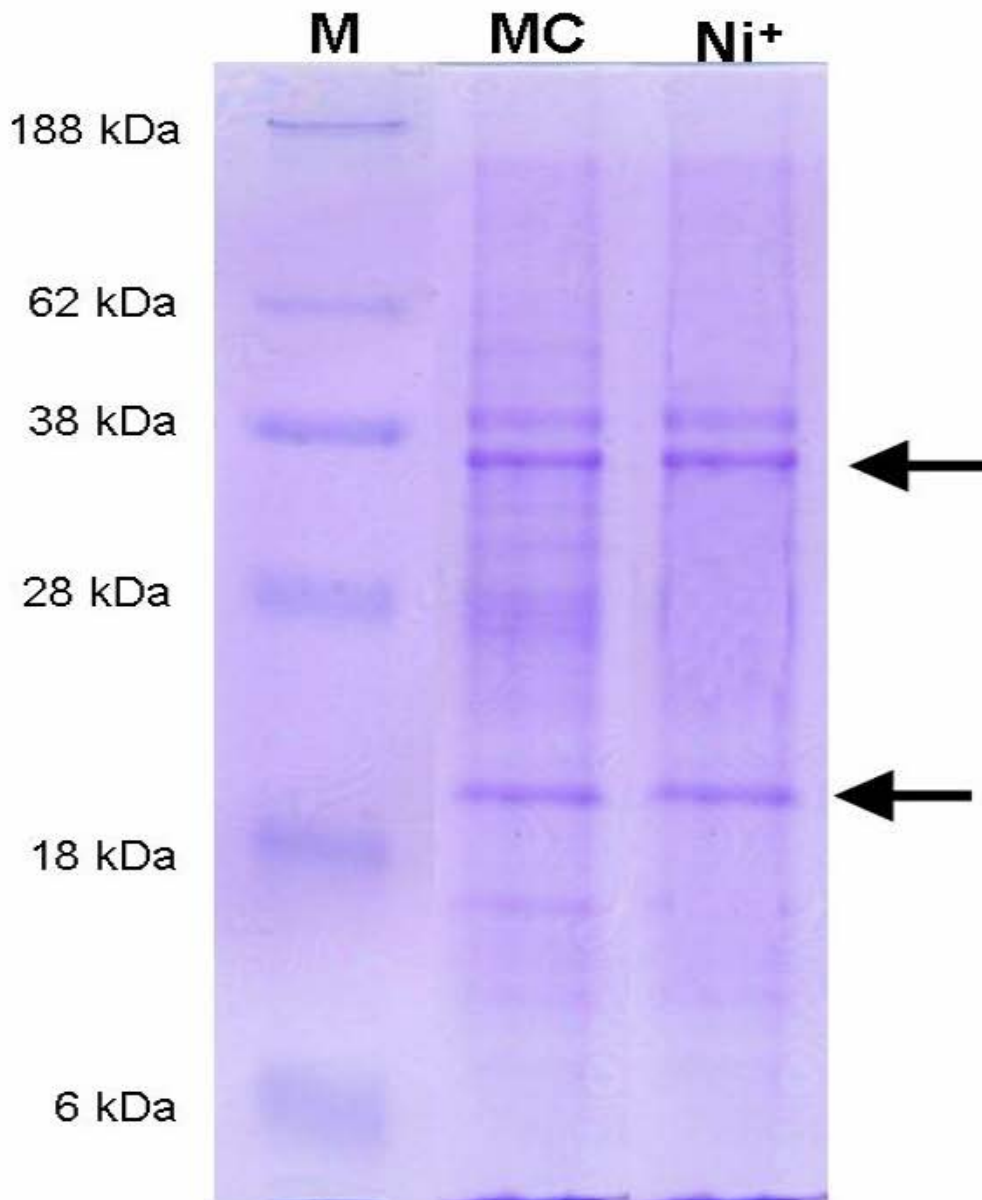


Figura 2. Gel de poliacrilamida de SDS-PAGE al 12% donde se visualizan las especies más prominentes de la proteína 3-AS (señaladas por las flechas), expresada en las células de *Drosophila* Schneider S2 y purificada por la columna de afinidad de Níquel. Tinción de azul de Coomasie.

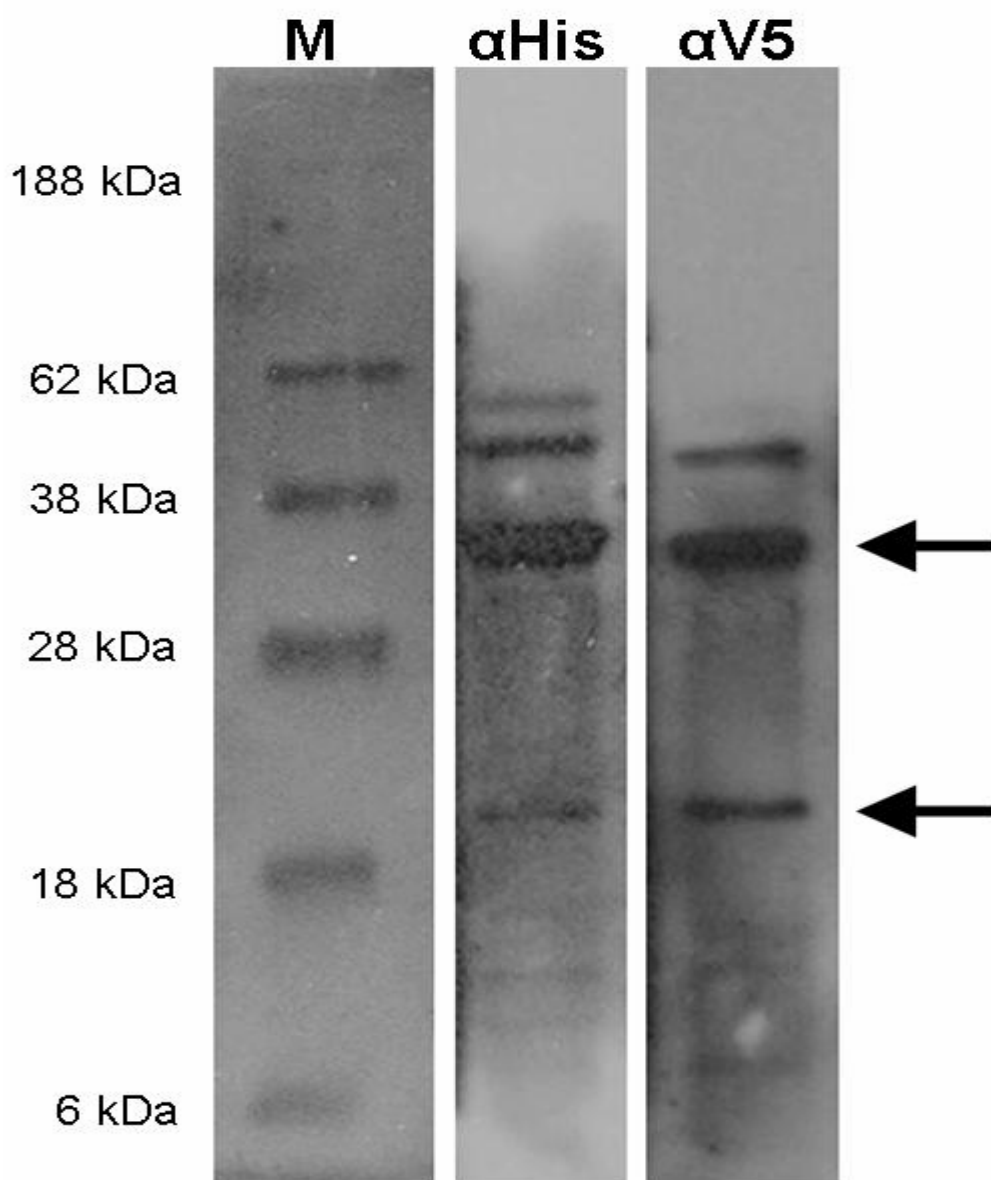


Figura 3. Inmunotransferencias de la proteína 3-AS purificada por la columna de afinidad de Níquel utilizando el anticuerpo anti-Histidinas y el anticuerpo anti-V5. Las flechas indican las especies más prominentes que se correlacionan con los geles teñidos por azul de Coomasie.