



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS
PROTEINAS QUE UNEN 5 -DIHIDROTESTOSTE-
RONA EN EL TEJIDO PROSTATICO "NORMAL"
HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LAYA ANTONIO CARRILLO



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.

CLAS TESIS 1979

ADQ M.T. 21

FECHA _____

REC _____

• _____



Jurado Asignado Originalmente Según El Tema.

PRESIDENTE:	PROFA. ESPERANZA SCHROEDER GUTIERREZ
VOCAL:	PROFA. GUADALUPE VELEZ PRATT
SECRETARIO:	PROFA. NATALIA DE LA TORRE ACEVES
1er. SUPLENTE:	PROFA. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ
2o. SUPLENTE:	PROF. HOMERO HERNANDEZ MONTES

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA DIVISION DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, CON LA AYUDA DE UNA BECA DEL FIDEI COMISO IMSS-FORD.

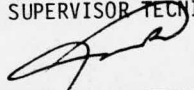
SUSTENTAMENTE


LAYA ANTONIO CARRILLO

ASESOR DEL TEMA


M. en C. NATALIA DE LA TORRE A.

SUPERVISOR TECNICO


DR. JOSE ARTURO BERMUDEZ
DIVISION DE BIOLOGIA DE
LA REPRODUCCION DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACION
BIOMEDICA DEL C.M.N.

A MIS PADRES:

Rosa del Alba y Nacir
por su orientación y cariño

A MIS HERMANOS:

Héctor, Angel, Yulia, René y Alfredo
por su ejemplo, motivación y apoyo

A MI ESPOSO:

Francisco
por su comprensión y amor

MI AGRADECIMIENTO

A los integrantes de la Sección de Mecanismo de Acción Hormonal,
en especial al doctor José Arturo Bermúdez.

A1 Q. Edgar Barahona Bustillos

A1 Biol. Joaquín Herrera Muñoz

A la Q.F.B. Jovita Bañuelos

A mis maestros

A la M. en C. Natalia de la Torre A.

CONTENIDO

CAPITULO I	INTRODUCCION.....	1
CAPITULO II	A) MATERIALES.....	6
	B) METODOS.....	9
	1. Procesamiento de muestras.....	9
	2. Determinación de proteínas totales.....	9
	3. Determinación de los porcentajes de unión.....	10
	4. Poza de homogeneizados.....	11
	5. Electroforesis en medio alcalino de disco en gel de poliacrilamida al 7.7%.....	12
	6. EGPA en medio alcalino con diferentes concentraciones de geles, para la determinación de pesos moleculares.....	17
	7. Estandarización de las proteínas para pesos moleculares con SDS.....	20
CAPITULO III	RESULTADOS.....	26
	A. Procesamiento de muestras.....	26
	B. Determinación de proteínas totales.....	26
	C. Determinación de los porcentajes de unión de las proteínas que unen 5 α DHT- ³ H.....	31
	D. Electroforesis de disco en gel de poliacrilamida al 7.7% de T en medio alcalino.....	31
	E. EGPA para la determinación de los pesos moleculares con diferentes concentraciones de geles en medio alcalino.....	32
	F. Estandarización de proteínas para la determinación de pesos moleculares con la técnica de EGPA con SDS.....	42
CAPITULO IV	DISCUSION.....	47

CONCLUSIONES.....	52
ABREVIATURAS GENERALES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	55

CAPITULO I

INTRODUCCION

Las glándulas genitales accesorias masculinas son estructuras altamente especializadas, ya que son reguladas bajo control neural y endocrino; sus secreciones contribuyen a la formación del fluido seminal humano, al cual se le atribuyen funciones de transporte y protección del espermatozoide. El análisis de este líquido ha sido utilizado para diagnósticos clínicos en algunos procesos patológicos frecuentes en estas glándulas, tales como: infecciones o inflamaciones en hombres jóvenes e hipertrofia y cáncer en la vejez. Para su formación, las secreciones, no son emitidas simultáneamente, sino que primero secretan las glándulas de Cowper y Littré, la segunda secreción es de la próstata, seguida inmediatamente por el fluido rico en espermatozoos de la ampulla y epidídimo; siendo la porción final y mayor del fluido derivada de las vesículas seminales (1).

Entre otros factores endocrinos que influyen sobre la actividad de las glándulas genitales accesorias al aparato reproductor masculino, se tienen las distintas hormonas esteroideas que producen efectos y respuestas variables, de los cuales cabe enunciar algunas generalidades; dado que sus tamaños moleculares son pequeños, atraviesan fácilmente la membrana celular encontrando proteínas de recepción intracelulares con alta afinidad localizadas en gran parte, si no en su totalidad en el citoplasma, para llegar rápidamente a los núcleos, pudiendo ser las respuestas modificadas por inhibidores de la síntesis de proteínas a nivel transcripcional o postranscripcional (2), estudiándose en la actualidad si son estos millares de moléculas del receptor neonuclear

ligados a las hormonas, las que están directamente implicadas en las respuestas, o bien pudiendo ser solo un sistema de transporte que para ser indispensable transmitiría al esteroide hormonal hacia otra entidad para que fuese desencadenada la respuesta biológica (2).

Las primeras investigaciones sobre receptores específicos de andrógenos que contienen las glándulas genitales accesorias del aparato reproductor masculino, se realizaron en animales (3-5), demostrándose en estos primeros intentos, la retención de andrógenos por los tejidos efectores. Posteriormente, las investigaciones se enfocaron a la búsqueda de proteínas receptoras de andrógenos, en extractos solubles del tejido prostático humano (6-9), dando lugar al interés creciente por obtener un conocimiento más claro del papel que desempeñan las hormonas esteroideas en el desarrollo y la evolución de las dos enfermedades principales de esta glándula en el humano, a saber, la hipertrofia prostática benigna y el cáncer prostático. Estas investigaciones demostraron que la dihidrotestosterona-³H, asociada con células de próstata, está estrechamente unida a proteínas receptoras y a bajas concentraciones de andrógeno radiactivo la dihidrotestosterona del sobrenadante del homogeneizado del tejido prostático, está exclusivamente unida a una proteína de alta afinidad y baja capacidad, formando un complejo esteroide-proteína. La afinidad del producto fisiológico por el receptor es grande y la constante de asociación en equilibrio del complejo hormona-receptor (siguiendo la ley de acción de las masas) es del orden de $K = 10^{10} \text{ M}^{-1}$ a 4°C, lo que implica una disociación lenta y una saturación fácil a las concentraciones fisiológicas hormonales (2), siendo la más importante de sus características, la estrecha especificidad hormonal, que se traduce por la ausencia de unión de los componentes sin actividad y por

cierta proporcionalidad entre la afinidad de esta unión y su actividad biológica.

Este paralelismo entre la afinidad y la actividad diferencia los receptores intracelulares de otras proteínas plasmáticas con capacidad de unir esteroides.

Los hallazgos de la retención selectiva de dihidrotestosterona por proteínas en células de próstata, confirmaron que la dihidrotestosterona es la forma activa del andrógeno Testosterona (10), siendo en la última década, uno de los avances más significativos en el estudio de los procesos moleculares de la acción de hormonas esteroideas.

En esta investigación, el objetivo principal fue la determinación de los pesos moleculares de las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en el sobrenadante del homogeneizado del tejido prostático "normal" humano, utilizando métodos con una alta capacidad de resolución y confiabilidad, siguiéndose un patrón definido el cual incluye:

- 1o. El estudio de la captación y retención de una hormona radiactiva.
- 2o. La identificación de la hormona supuestamente activa.
- 3o. La detección y aislamiento de proteínas específicas que unen al esteroide con una alta afinidad y que existe en mayor cantidad en las células de próstata que en células insensibles.
- 4o. La determinación del peso molecular de las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en el tejido prostático "normal" humano.

La investigación de los pesos moleculares de las proteínas comenzó con cierto éxito, utilizándose métodos físicos tales como el crioscópico dispersión de la luz, etc. (11, 12). Posteriormente, se emplearon procedimientos fisicoquímicos de sedimentación con ultracentrífuga como son: velocidad de sedimentación, equilibrio de sedimentación, aproximación al equilibrio de sedimentación y el equilibrio en solución guanidina-HCl (13). La cromatografía en gel (filtración en Sephadex) es actualmente uno de los métodos más utilizados en el laboratorio (14), mientras que la determinación del peso molecular por electroforesis en gel de disco, se encuentra aún en experimentación con algunos resultados alentadores. Una de las ventajas de la electroforesis en gel, es la posibilidad de separar mezclas de proteínas globulares en disolución, basándose en sus diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico, a un pH determinado, teniendo además como soporte inerte, el gel de poliacrilamida lo que permite realizar el análisis con gran precisión, debido a su alto poder de resolución, con cantidades mínimas de mezclas complejas de proteínas. En la EGPA, la separación toma lugar, debido a las diferencias de cargas y tamaños de las moléculas. La influencia de la carga representa una dificultad en los métodos de la determinación de los pesos moleculares por electroforesis en gel, dividiéndose los experimentos hasta la fecha realizados para su eliminación en dos categorías. En la primera categoría, la EGPA se lleva al cabo en geles de diferentes densidades y el coeficiente de la distancia de migración (o coeficiente de retardación) se mide completamente independiente de la carga. En la segunda categoría, las condiciones electroforéticas (amortiguadores, densidad de gel) son escogidas de tal manera que las diferencias de cargas sean mínimas, pudiendo ser ignoradas (15).

Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en el sobrenadante del homogeneizado del tejido prostático "normal" humano, se realizaron los estudios, utilizando los dos procedimientos antes mencionados. Dentro de la primera categoría y basándonos en trabajos previos, relacionados con la obtención de pesos moleculares de proteínas en EGPA, realizados por Zwaan (15) y por Atanasov y Gikov (16), quienes determinaron el PM de algunas de las 15 bandas características de proteínas encontradas en el fluido prostático; en este trabajo se utilizaron diferentes concentraciones de gel, obteniéndose las movilidades relativas para la construcción de una curva lineal de Ferguson, cuya pendiente es una medida del PM y ha sido designado por algunos autores como el coeficiente de retardación (17).

Para la segunda categoría de la determinación del PM de las proteínas por EGPA, con eliminación de carga, Shapiro y Col. (18) incorporaron SDS en su sistema de amortiguación, encontrando una relación lineal inversa entre la distancia de migración relativa y los pesos moleculares lo que permite la rápida y simple estimación de este parámetro en proteínas y polipéptidos. De acuerdo con informes posteriores de Weber y Osborn (19), quienes utilizaron este método para la estandarización de proteínas conocidas, efectuamos la determinación de los pesos moleculares de las proteínas semipurificadas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en el sobrenadante de los homogeneizados del tejido prostático "normal" humano, utilizando el mismo sistema electroforético, tanto para las muestras tisulares, como para los patrones de proteínas con pesos moleculares conocidos.

Se reportan los resultados y se presenta una discusión de los mismos.

CAPITULO II

I MATERIALES

I A- Material Químico

De ABBOTT:

De Amersham/Searle: líquido de centelleo- 4g de PPO (2,5-difeniloxazol, grado centelleo) y 0.05 g de POPOP (1,4-bis [2-(5-feniloxazolil)] benceno, grado centelleo en un litro de tolueno.

De Baltimore Biol. Labs: gelatina.

De Carlo Erba: colorante- azul de bromofenol.

De Dade Harleco: HCl conc y H_2PO_4 conc.

Colorante-negro de amido.

De Eastman: EDTA (ac. etilendiamino tetracético, sal sódica), TEMED (N,N,N',N', tetrametilendiamino).

De Matheson Coleman & Bell: carbón activado.

De Merck: a) catalizador químico-persulfato de amonio; b) fotocatalizador-riboflavina; c) disolventes grado analítico y destilados antes de su uso - etanol, acetona y tolueno; Acrilamida; N,N'-Metilen-diacrilamida; TCA (ac. tricloroacético); sacarosa; glicina; SDS (Dodecilo hidrogeno sulfato; sal sódica) para exámenes de sustancias tensoactivas; Brij 35 (éter laurílico de polioietileno, detergente); 2-mercaptoetanol; fosfato de potasio dibásico y monobásico y azida de sodio.

De Monterrey: ácido acético glacial, fosfato de sodio dibásico y monobásico.

De New England Co.: esteroide radiactivo- 5α DHT- 3H (dihidrotes-

tosterona tritiada) con A.E. de 40 Ci/mM.

De Farmacia: Dextrán T₄₀

De Sigma Chemical Company: la siguiente serie de proteínas para la determinación de los pesos moleculares con SDS.

BSA (albúmina sérica bovina)

Ovoalbúmina (albúmina de huevo)

Pepsina (mucosa de estómago de porcino)

Tripsinógeno (páncreas de bovino)

β -lactoglobulina (leche de bovino)

Lisosima (clara de huevo)

Hemocianina (caballo)

De Packard: líquido de centelleo; Insta Gel.

I B- Material Biológico.

Próstata "normal" humana. Se utilizaron próstatas de individuos sin ninguna alteración relacionada con el funcionamiento del aparato genito-urinario, proporcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las muestras se obtuvieron durante las primeras 12 horas, después de haber fallecido el paciente y se conservaron en refrigeración a 4°C, hasta su procesamiento. (un máximo de 24 horas).

I C- Equipo

Agitadores por vibración Super Mixer; agitadores magnéticos max/mix de precisión. Balanzas Mettler, modelo P-120 L y B.

Centrífuga Damon IEC modelo PR-6,000.

Cámara de electroforesis con fuente de poder y unidad refrigerante de Buchler.

Espectrofotómetro UV-LV Hitachi de Perkin Elmer.

Homogeneizador modelo Virtis.

Horno de presión reducida Thelco, modelo 19.

Liofilizador reducido Virtis

Potenciómetro modelo 3550 de Beckman.

II METODOS

1. Procesamiento de Muestras.

Las próstatas recolectadas fueron tratadas de la forma siguiente: eliminación del tejido adyacente, obtención del peso y corte en rebanadas de aproximadamente 2 mm de espesor, agregando 20 ml de solución salina isotónica para facilitar la homogeneización llevada al cabo en un homogeneizador con aspás, de alta velocidad, durante una hora; al terminar se agregaron 80 ml de solución salina isotónica para centrifugación a 2,125xg (3000 rpm) a 4°C durante 30 minutos. Los sobrenadantes repartidos en alícuotas de 5 ml estuvieron conservados en congelación hasta su utilización.

Todo el procesamiento de muestras fue realizado a 4°C.

2. Determinación de Proteínas Totales por el Método de Groves (20).

Preparación de Reactivos:

Acido etilendiaminotetracético amortiguador (EDTA)	1mM 0.416 g/l de H ₂ O
Tris HCl	10mM 1.211 g/l de H ₂ O
Brig 36 T	1mM 0.626 g/l de H ₂ O

Llevar la solución a un pH=7.4 con HCl concentrado.

Preparación de la curva estándar:

Se tomaron concentraciones de 10 µg/ml a 100 µg BSA/ml de solución salina isotónica; se llevan a un volumen de 2 ml con el amortiguador anterior (pH 7.4) y se agitan. A cada muestra le fueron leídas sus absorbancias a dos longitudes de onda de 224 y 233 nm en un espectrofotómetro UV-LV.

Los valores de Δ Abs contra los µg de BSA fueron llevados a una gráfica.

En las primeras seis muestras obtenidas de los homogeneizados de próstatas "normales" humanas, utilizando volúmenes de 10 μ l a 100 μ l con intervalos de 10 μ l de homogeneizado, se determinó el volumen óptimo a utilizar en las mediciones de las proteínas totales, el cual fue 25 μ l de muestra biológica. La muestra de homogeneizado de cada próstata fue llevada a un volumen de 2 ml con el amortiguador a pH=7.4 y se siguió en las mismas condiciones que en la curva patrón la metodología para la determinación de proteínas totales. Las lecturas de Δ Abs de los homogeneizados se interpolaron en la curva estándar de BSA, obteniéndose la cantidad de proteínas totales presentes en la muestra.

3. Determinación de los Porcentajes de Unión.

Los porcentajes de unión de la 5α DHT- 3 H de las proteínas presentes en los homogeneizados de próstatas "normales" humanas fueron determinados utilizándose la técnica siguiente:

En base a la cantidad de proteínas totales por μ l de homogeneizado, se utilizó el volumen necesario de cada muestra (aproximadamente 2000 μ g de proteína/ volumen). Midiéndose estos volúmenes por triplicado (confiabilidad) y agregando a cada uno 5α DHT- 3 H (aproximadamente 251,814.0 dpm en 5 μ l), llevándolos a un volumen de 1 ml con amortiguador RIA y una vez agitados se incubaron a 4°C durante 22 horas.

Terminada la incubación se agregaron a cada tubo 200 μ l de C/D al 0.25% para centrifugar a 2,125 xg durante 15 minutos a 4°C y decantar los sobrenadantes a frascos viales, agregándoles 10 ml de Insta-Gel. Cada muestra fue contada durante 15 minutos.

Cálculo:

$$\% \text{ Unión} = \frac{\bar{X}_{\text{cpm (muestra)}} - \bar{X}_{\text{cpm (n)}}}{\bar{X}_{\text{cpm (t)}}} \times 100$$

Preparación de Reactivos.

a) Amortiguador para Radioinmunoanálisis (RIA)

Fosfatos de Potasio	0.25 M
Gelatina	0.1 %
Azida de Na	0.1 %

Ajustar a un pH 6.9 y aforar a 1 lt con H₂O.

b) Suspensión de Carbón-Dextrán (C/D)

Carbón	0.25 g
Dextrán T ₄₀	0.25 g
Suspender en 100 ml de H ₂ O	

4. Poza de Homogeneizados.

La poza fue formada con homogeneizados de próstatas "normales" humanas, con muestras que presentaron un porcentaje de unión mayor del 20%; para este propósito se tomaron 5 ml de cada sobrenadante de homogeneizados, centrifugándolos a 15,000 xg (11,000 r.p.m.) durante 30 minutos a 4°C. Estos segundos sobrenadantes fueron recolectados en alícuotas de 5 ml. Se determinó la cantidad de proteínas totales en estas muestras por el método de Groves. Las muestras permanecieron congeladas a -15°C hasta su utilización.

5. Electroforesis en Medio Alcalino de Disco en Gel de Poliacrilamida
al 7.7%. (21)

Preparación de Reactivos

1. HCl 1N 48 ml
Tris 36.6 g
Temed 0.23 ml
Ajustar pH a 8.9 con HCl conc. Aforar a 100 ml con H₂O dest.

2. Acrilamida 30.0 g
Bisacrilamida 0.8 g
Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

3. Persulfato de amonio 0.14 g
Aforar a 100 ml con H₂O destilada.
Nota: se prepara el mismo día en que se va a utilizar.

4. HCl 1N 48.00 ml
Tris 5.98 g
Temed 0.46 ml
Ajustar pH a 6.7 con HCl conc. Aforar con H₂O a 100 ml.

5. Acrilamida 10.00 g
Bisacrilamida 25.00 g
Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

6. Riboflavina 4 mg
Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

7. Sacarosa 40.0 g
Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

Solución amortiguadora.

Tris 6.0 g
Glicina 28.8 g
Ajustar pH a 8.3. Aforar a 1000 ml con H₂O destilada.
Para usarse se diluye 1/10 con H₂O destilada.

Todas las soluciones anteriores (excepto la número 7) son filtradas en papel Whatman No. 1 y guardadas en un recipiente obscuro a 4°C.

Indicador del frente iónico.

1 ml de Azul de Bromofenol al 0.001% en etanol.

Colorante de geles.

Negro de amido 1 g/100 ml de ácido acético al 7%.

Polaridad de los geles.

Polo superior (-) negativo

Polo inferior (+) positivo

Proporción de los reactivos para la preparación de los geles al 7.7%.

Gel Espaciador

1 parte del reactivo No. 4

2 partes del reactivo No. 5

1 parte del reactivo No. 6

4 partes del reactivo No. 7

Gel Separador

1 parte del reactivo No. 1

2 partes del reactivo No. 2

1 parte de H₂O destilada

4 partes del reactivo No. 3

Debido a que las concentraciones del gel espaciador (T=5.0 y C=2.5) permiten que las proteínas se "organicen" en cuanto a peso molecular y carga, se utilizó este gel antes del gel separador, en el cual las proteínas migran a una determinada velocidad dependiendo de sus características fisicoquímicas.

Cálculos

$$\% T = \frac{\text{Acrilamida} + \text{Bisacrilamida}}{100}$$

$$\% C = \frac{\text{Bisacrilamida} \times 100}{T}$$

PREPARACION DE GELES

Los tubos de vidrio para los geles de la electroforesis, tienen una longitud de 10 cm. y un diámetro interno de 0.5 cm., antes de ser utilizados fueron lavados y tratados con síliclad/H₂O al 1%.

Gel separador: mezclar

2 ml del reactivo # 1

4 ml del reactivo # 2

2 ml de H₂O destilada

Extraer el aire con vacío y agitación durante 15 minutos. Agregar rápidamente 8 ml del reactivo # 3 y aplicar vacío durante un minuto. Adicionar de esta solución 1.9 ml a cada tubo de electroforesis y sobre ella unas gotas de H₂O para evitar la formación de menisco en el gel al polimerizar la solución.

Gel espaciador: mezclar

1 ml del reactivo # 4

2 ml del reactivo # 5

1 ml del reactivo # 6

4 ml del reactivo # 7

Retirar el H₂O de la superficie del gel separador, adicionar 50 µl de la solución del gel espaciador, con unas gotas de H₂O en su superficie y efectuar la polimerización en una cámara de LV durante 15 minutos.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EGPA

Para determinar el patrón electroforético y los porcentajes de unión de las proteínas que unen 5α DHT- 3 H en la muestra individual (P_4) y de la poza de homogeneizados, se incubaron 880 μ l de P_4 con 5α DHT- 3 H (685,320 cpm/20 μ l) y 1350 μ l de la poza con 5α DHT- 3 H (856,650 cpm/25 μ l) durante 22 horas con agitación a 4°C. La cantidad adecuada de esteroide radiactivo utilizado en las incubaciones fue de aproximadamente 90,000 cpm/gel, con lo cual se definieron perfectamente los picos de unión de las proteínas.

Terminada la incubación, alícuotas de 110 μ l de P_4 (611.10 μ g de proteína) y 150 μ l de poza (618.4 μ g de proteína) se adicionaron en frascos viales y fueron contadas durante 1 minuto con líquido de centelleo-Flúor. A los homogeneizados restantes se les agregaron por cada 200 μ l de muestra biológica, 300 ml de C/D al 0.125%, centrifugándose la mezcla a 2.125 xg (3000 r.p.m.) durante 15 minutos a 4°C. Al decantar los sobrenadantes cuando no se eliminaba completamente el CID, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones.

A los sobrenadantes obtenidos, se les agregó sacarosa, aproximadamente del 20 al 30%, con el objeto de aumentar sus densidades sin afectar las propiedades de la unión de las muestras.

Se aplicaron a cada uno de ocho tubos para electroforesis, cuatro alícuotas de 110 μ l del homogeneizado individual P_4 y cuatro alícuotas de 150 μ l de la poza.

El compartimiento inferior (electrodo positivo) de la cámara para EGPA,

se llenó con amortiguador pH 8.3 diluido 1/10 y una vez preparados los tubos para electroforesis con gel, se colocaron en el compartimiento superior (electrodo negativo), se les adicionó el amortiguador pH 8.3 diluido 1/10 mezclado con 3 o 4 gotas de ABF (frente iónico), llevándose a cabo la electroforesis con una corriente constante de 5 mAmp por gel.

Al terminar la electroforesis se midió el volumen total del amortiguador del compartimiento superior, tomándose dos alícuotas de 1 ml para contar la radiactividad como control de la radiactividad que se sale, debido a la manipulación de la cámara. A los tubos de la electroforesis es necesario colocarlos en hielo para enseguida sacar los geles contenidos en ellos. A los geles de cada muestra se les determinaron las longitudes de migración de sus f.i., bandas visibles y la longitud total del gel, colocándolos en tubos para congelación rápida en acetona-hielo seco y así facilitar su corte con un rebanador especial, las rebanadas fueron obtenidas en forma uniforme con un espesor de 1.25 mm. Cada rebanada fue colocada en un frasco vial, agregándose 5 ml del líquido de centelleo-Flúor y transcurridas 24 horas de elución fueron contados durante un minuto en el espectrofotómetro de centelleo líquido.

A los geles restantes se les dió el siguiente tratamiento:

Tinción de los Geles

Colocar los geles en TCA al 10% durante 24 horas, lavar con H₂O destilada y teñir con Negro de Amido al 0.1% en ácido acético al 7% durante 2 horas. Lavar los geles nuevamente con H₂O por último agregar ácido acético al 7%, cambiándolo hasta que se tenga un fondo claro y queden únicamente teñidas las proteínas.

6. EGPA en Medio Alcalino con Diferentes Concentraciones de Geles,
para la Determinación de Pesos Moleculares.

Preparación de los Geles

Seguir el mismo procedimiento del método anterior, así como las mismas soluciones, únicamente variando sus proporciones en la preparación de los geles separadores.

Concentración al 5%

Gel separador

1 parte del reactivo No. 1
1.2960 partes del reactivo No. 2
1.7040 partes de H₂O destilada
4.0 partes del reactivo No. 3

Concentración al 7%

Gel separador

1.0 partes del reactivo No. 1
1.8144 partes del reactivo No. 2
1.1856 partes de H₂O destilada
4.0 partes del reactivo No. 3

Concentración al 7.7% (ya descrito)

Concentración al 9%

1.0 parte del reactivo No. 1

2.3328 partes del reactivo No. 2

0.6672 partes de H₂O destilada

4.0 partes del reactivo No. 3

Preparar tres geles de cada concentración.

Obtención de la Curva Estándar para PM de Proteínas.

La proteína patrón utilizada fue una muestra comercial de BSA, la cual después de la EGPA en medio alcalino, presentó 5 bandas.

La aplicación a los geles en cada concentración (5, 7, 7.7 y 9%) se hizo por triplicado, siendo de 200 µg de BSA/100 µl de solución salina isotónica. Una vez desarrollada la electroforesis y teñidos los geles, se midieron las distancias de migración de las bandas de proteína y las distancias de migración de los f.i. para obtener los datos de las movilidades electroforéticas relativas.

$$R_f = \frac{\text{distancia de la migración de las proteínas}}{\text{distancia de la migración del azul de bromofenol}}$$

(22)

La obtención de la curva estándar para la determinación de los PM fue realizada a partir de una gráfica de Ferguson obtenida con los $\log R_f$ de las diferentes bandas de BSA, contra las concentraciones de los geles (23) y las pendientes de las curvas resultantes, fueron llevadas

a una gráfica contra los valores de los pesos moleculares conocidos.

Procedimientos para la Determinación de los Pesos Moleculares de las Proteínas que Unen 5α DHT- 3 H.

Con el fin de determinar con exactitud únicamente los PM de las proteínas que unen 5α DHT- 3 H en la poza de homogeneizados del tejido prostático "normal" humano, se realizó el procedimiento siguiente:

Incubación de 2,400 μ l de la poza de homogeneizados con 5α DHT- 3 H (1,541,970 c.p.m./45 μ l) durante 22 horas a 4°C en agitación constante. De la poza incubada se tomaron 2 alícuotas de 50 μ l y a la incubación restante se le agregó 3,450 μ l de C/D al 0.125%, centrifugándose 2 veces a 2,125 xg (3,000 rpm) durante 15 minutos a 4°C, para finalmente tomar del sobrenadante 2 alícuotas de 50 μ l. Las alícuotas tomadas antes y después de la incubación fueron contadas para determinar el porcentaje de esteroide unido a la proteína que se va a aplicar al gel. Se preparan 4 geles para cada concentración (5%, 7%, 7.7% y 9%) y se aplican a cada gel 150 μ l de la poza incubada.

Desarrollo de la electroforesis.

Medición de las longitudes de migración de las bandas visibles de f.i. y la longitud total del gel, congelar y rebanar. Las rebanadas colocarlas en frascos viales, adicionar 5 ml de líquido de centelleo-Flúor, dejar eluir durante aproximadamente 24-48 horas y contar la radiactividad de cada rebanada.

Las gráficas se realizaron con los valores de las dpm contra el No. de rebanada, localizando en la gráfica los picos de unión de 5α DHT- 3 H y calculándose los R_f de los picos correspondientes a las proteínas que unen la 5α DHT- 3 H.

$$\text{Long. de la Rebanada} = \frac{\text{Long. total del gel}}{\text{No. de Reb. totales}}$$

$$R_f = \frac{\text{No. de rebanada} \times \text{Long. de la rebanada}}{\text{Long. de migración del f.i.}}$$

La gráfica de Ferguson se construyó con los logaritmos de los R_f contra las diferentes concentraciones de los geles utilizados. Las pendientes resultantes de cada curva de las proteínas individuales que unieron 5α DHT- 3 H se interpolaron en la curva estándar de ASB.

7. Estandarización de las Proteínas para Pesos Moleculares con SDS (18,19).

Preparación de Reactivos

(Usar agua destilada o deionizada)

1a) Amortiguador-Muestra

Mezclar las siguientes sustancias:

NaH_2PO_4 (Anhidro) 0.34 g; Na_2HPO_4 (Anhidro) 1.02 g; Urea 36.0 g; Azul de bromofenol 0.005 g; 2-Mercaptoetanol 1.0 ml; ya mezclados se diluyen con 80 ml de H_2O . Agregar SDS 1.0 g, diluir y aforar a 100 ml con H_2O . Ajustar a pH 7.0 y a 25°C con ácido fosfórico.

La solución es estable por lo menos 2 semanas en refrigeración de 0-5°C.

2a) Amortiguador-Gel

Mezclar:

NaH_2PO_4 6.8 g; Na_2HPO_4 20.45 g; disolver en 80 ml de H_2O . Agregar SDS 2.0 g; ajustar el pH a 7.0 a 25°C con ácido fosfórico y aforar a un litro con H_2O .

Almacenar en refrigeración de 0-5°C, siendo estable para su uso en ausencia de crecimiento microbiano visible.

3a) Geles de Acrilamida

Gel al 10%; para su uso con proteínas de PM de aproximadamente 10,000-70,000.

Para preparar 12 geles, mezclar: Acrilamida, 22.2 g; NN'-Metilen-bis-Acrilamida, 0.6 g. Disolver y diluir a 100 ml con H_2O . Eliminar el material insoluble por filtración.

La solución es estable durante un mes, conservada en un frasco obscuro, tapado y en refrigeración de 0-5°C.

Gel al 5% para su uso con proteínas de PM de aproximadamente 70,000-280,000.

Para preparar 12 geles utilizar la mitad de las concentraciones anteriores en el mismo volumen de H_2O .

4a) N,N,N',N',-Tetrametilen diamino (TEMED)-0.77 kg/lt.

Guardar a temperatura ambiente.

5a) Solución de persulfato de amonio.

Prepararlo el día de su uso.

Disolver aproximadamente 100 mg de persulfato de amonio en 15 ml de H₂O. Guardar a temperatura ambiente durante un día únicamente.

Preparación de Muestras

Preparación de las proteínas patrones para la determinación de pesos moleculares con SDS.

TABLA I

Proteína	Concentración mg/ml	Amortiguador Muestra (ml)
Albúmina bovina	1.5	8.5
Ovoalbúmina	1.5	17
Pepsinógeno	5.0	5
Tripsinógeno	2.0	12.5
β-lactoglobulina	1.0	25
Lisosima	1.0	25

Las alícuotas pueden ser guardadas a -20°C para su uso futuro.

Todas las proteínas deben ser incubadas a 37°C durante dos horas en el amortiguador-muestra, justamente antes de la electroforesis.

Muestra aplicada 20 µl/gel.

Preparación de la muestra biológica (poza) para la determinación de los PM desconocidos de las proteínas que unen 5 αDHT-³H.

Incubación y electroforesis de las muestras.

Preparar dos incubaciones, la primera con un volumen de 1,050 µl de poza con 20 µl de 5 αDHT-³H (685,320 cpm) y la segunda con 9,600 µl de poza

sin material radiactivo, dejándolas en agitación durante 22 horas a 4°C.

De la primera incubación, tomar dos alícuotas de 150 µl cada una para contar.

Agregar a los homogeneizados restantes 300 µl de C/D al 0.125% para cada 200 µl de volumen de muestra. Centrifugar dos veces a 2,125 xg durante 15 minutos a 4°C. De la muestra sobrenadante de la primera incubación, tomar dos alícuotas de 150 µl para contar.

Preparar previamente 72 geles al 7.7% con el método No. 5 descrito anteriormente.

A las dos incubaciones, agregarles, sacarosa al 20% del volumen total, diluir y aplicar sobre cada una de cuatro geles, 150 µl de muestra de la primera incubación y a los 68 geles restantes, 150 µl de la muestra de la segunda incubación (sin material radiactivo).

Desarrollar la electroforesis aplicando una corriente constante de 5mAmp/gel hasta que el azul de bromofenol (f.i) esté a aproximadamente 0.5-1.0 cm . del extremo inferior del gel.

Para la extracción y separación de las proteínas que unen 5α DHT- 3 H de los geles, efectuar los siguientes pasos metodológicos:

Una vez rebanados los cuatro geles con muestra radiactiva de la primera incubación, colocarlos en frascos viales con líquido de centelleo-Flúor y transcurridas aproximadamente 24 horas de elución, contarlos. Hacer

una gráfica con las dpm obtenidas, contra el número de rebanada para la localización de las rebanadas donde se encuentren los "picos" de unión de 5α DHT- 3 H.

Los geles con muestras de la segunda incubación, no radiactiva, rebanarlos y concentrar las rebanadas de la No. 1 a la No.18, la banda visible y el f.i. por separado.

Las proteínas de las rebanadas de gel concentradas, eluir las con H_2O , durante dos días a $4^\circ C$. Llevar a liofilizar los eluidos y una vez obtenidos los liofilizados de proteínas, disolverlos en 1 ml de amortiguador muestra e incubarlos a $37^\circ C$ durante dos horas para la electroforesis con SDS.

Preparación de los geles para electroforesis con SDS.

Para preparar 12 geles: mezclar 15 ml de amortiguador-gel (reactivo 2a); 13.5 ml de acrilamida-gel (reactivo 3a=10% o 3a''= 5%). Aplicar vacío con agitación durante 1 minuto y adicionar 1.5 ml de persulfato de amonio (reactivo 5a), más 0.05 ml de temed (reactivo 4a). Aplicar vacío durante 15 segundos.

Agregar de la solución anterior, 1.9 ml a cada tubo para la electroforesis, utilizando una jeringa con un tubo de hule largo, introduciéndolo hasta el fondo del tubo, agregando la solución para desplazar todo el aire contenido en el tubo y así evitar que se formen burbujas al polimerizar la solución. Antes de que se forme el gel, aplicar una gota de H_2O sobre la solución del gel.

ELECTROFORESIS

La realización de la EGPA con SDS, llevarla al cabo en las siguientes condiciones:

Diluir 500 ml de amortiguador-gel (reactivo 2a) con 1000 ml de H₂O. Decantar el H₂O de la superficie del gel y agregar la solución del amortiguador hasta llenar el tubo. Colocar los tubos para electroforesis en la cámara superior y llenar los compartimientos del aparato de electroforesis con amortiguador-gel diluido. Bajo la capa de amortiguador agregar las muestras sobre el gel.

Aplicar una corriente constante de 8 mAmp/gel hasta que el indicador de ABF esté a 0.5-1cm del ánodo o final de cada tubo (cerca de 5 horas).

Al término de la electroforesis, sacar los geles y marcar los f.i. con un alambre delgado. Teñir los geles con el método de tinción descrito (No. 5) y una vez teñidas todas las bandas, calcular sus R_f midiendo las distancias de migración de sus frentes iónicos y las distancias de migración de las proteínas.

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de la migración del azul de bromofenol}}$$

Llevar a una gráfica, los valores de R_f contra el PM conocido, sobre papel semilogarítmico. Determinar los pesos moleculares desconocidos, interpolando los valores de los log R_f de las proteínas que unieron 5 α DHT-³H en las muestras de homogeneizados de próstatas "normales" humanas.

CAPITULO III

RESULTADOS

IIIA) Procesamiento de Muestras.

Fueron recolectadas y procesadas 26 muestras de próstatas "normales" humanas, con pesos que variaron de 15 a 25 g de las cuales fueron utilizadas 10 muestras en base a su capacidad de unión.

IIIB) Determinación de Proteínas Totales.

En este estudio, se efectuaron los primeros ensayos, con BSA utilizada para la obtención de la curva estándar en la determinación de las proteínas totales por el método de Lowry (24), obteniéndose una curva lineal (Fig. 1) de BSA en los límites de 10 μg a 100 μg . Con el objeto de observar la estabilidad de la reacción colorimétrica, en el método de Lowry se obtuvo una gráfica de las variaciones de las lecturas de Abs contra diferentes tiempos (Fig. 2), donde se observó que a mayor concentración de proteínas y conforme aumenta el tiempo entre las lecturas de una misma muestra, aumenta la absorbancia de estas. Debido a la variabilidad observada en el método de Lowry, se utilizó el método de Groves, para cuantificar proteínas obteniéndose curvas estándares lineales en concentraciones de 10 μg a 100 μg de BSA (Fig. 3). El resultado fue que las lecturas de Abs no varían después de 48 horas, por lo tanto, se decidió utilizar este último método para las determinaciones de proteínas totales de los homogeneizados de próstata "normal" humana, incluyendo en cada ensayo junto con las muestras problema una curva estándar

CURVA PATRON DE PROTEINAS (LOWRY)

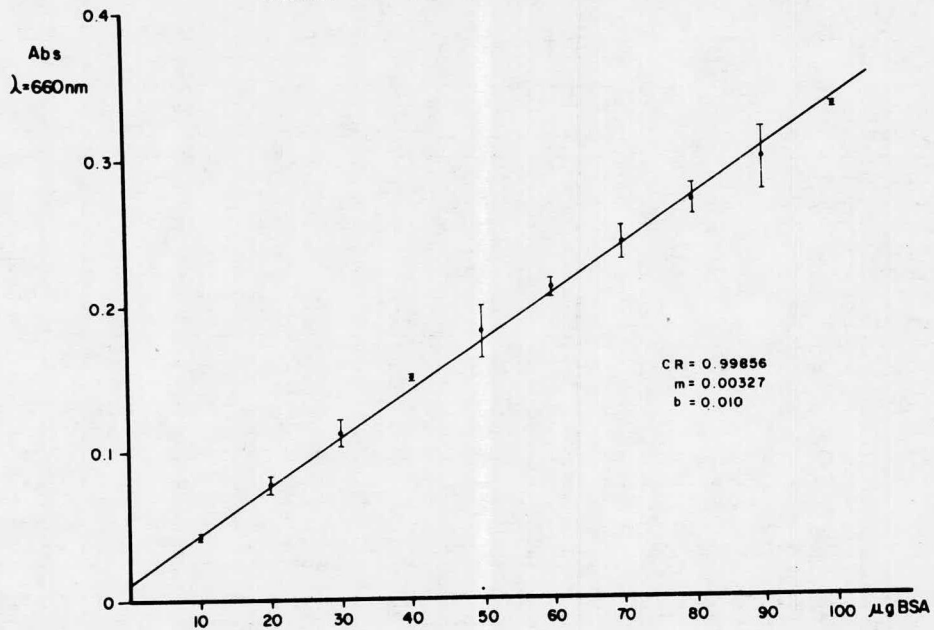


Fig. 1

Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación de proteínas totales, utilizando el método de Lowry (24).

DETERMINACION DE PROTEINAS (LOWRY)

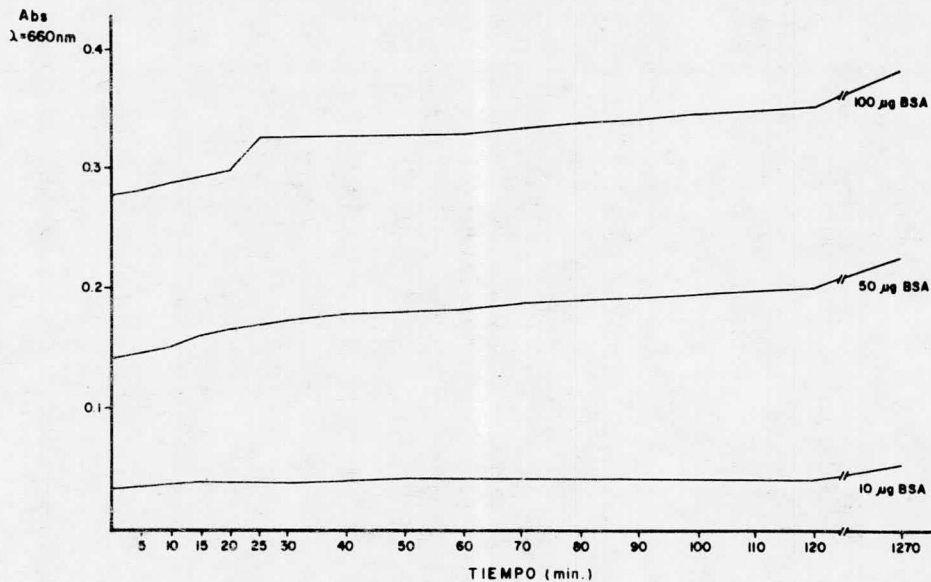


Fig. 2

Variaciones en las lecturas de absorbancia (Abs) con respecto al tiempo en el método de Lowry, utilizando tres concentraciones diferentes de proteína (BSA).

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES
(GROVES)

CURVA ESTANDAR $\lambda = 224 - 233$

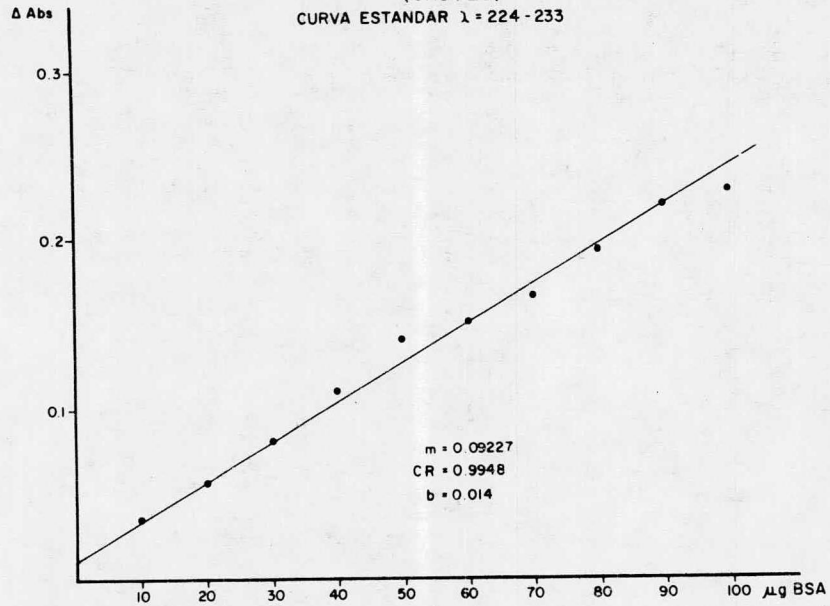


Fig. 3

Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la cuantificación de proteínas totales, utilizando el método de Groves (20). El ΔAbs es la diferencia entre las lecturas de absorbancia tomadas a dos longitudes de onda $\lambda=224-233$ nm, representando cada punto el promedio de tres determinaciones de BSA.

de BSA.

En la Tabla II se muestran los resultados promedios de la cuantificación de las proteínas totales de las muestras que se utilizaron en toda la experimentación en base a su mayor porcentaje de unión.

TABLA II

"Determinación de Proteínas Totales por el Método
de Groves" $\lambda=224-233$ nm

Muestra	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₉	P ₁₀	P ₁₃
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.92	5.51	2.16	4.0	4.6	5.0	4.8	5.4
Muestra	P ₁₅	P ₂₀	P ₂₁	P ₂₃	Poza	Promedio	Desviación Estándar	
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5.4	5.2	4.7	9.0	4.70	5.18	1.564	

Los valores de concentración de las proteínas totales fluctuaron en límites amplios de 2.16 a 9.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

IIIC) Determinación de los Porcentajes de Unión de las Proteínas que Unen 5 α DHT-³H.

TABLA III

Porcentajes de Unión a 5 α DHT-³H

Muestra	V (ml)	% Unión	Muestra	V (ml)	% Unión
P ₃	0.280	22.4	P ₁₃	0.380	25.6
P ₄	0.360	31.9	P ₁₅	0.380	25.2
P ₅	0.930	22.1	P ₂₀	0.390	22.2
P ₆	0.510	21.0	P ₂₁	0.430	32.3
P ₇	0.430	28.7	P ₂₃	0.222	22.0
P ₉	0.400	20.8	Poza	0.426	34.5
P ₁₀	0.420	28.7			

En este experimento (Tabla III) se obtuvieron valores del 20 al 30% de unión con las muestras individuales y a excepción de la P₄, que presentó en todas sus determinaciones un porcentaje mayor al 30% de unión, solo la poza presentó 34.5% de unión, valor aceptable para la continuación del estudio.

IIID) Electroforesis de Disco en Gel de Poliacrilamida al 7.7% de T en Medio Alcalino.

Este método fue utilizado por considerarlo adecuado para identificar a las proteínas específicas que unen 5 α DHT-³H en los sobrenadantes de los homogeneizados del tejido prostático "normal" humano y después de varios ensayos, para determinar las condiciones óptimas de aplicación de las muestras (cantidad, condiciones, etc.), se obtuvieron los siguientes

resultados:

TABLA IV

Muestra	% Unión	cpm
P ₄	50%	31,000
Poza	37%	20,000

En este análisis de la asociación de 5α DHT-³H con los sobrenadantes de los homogeneizados, se demostró la presencia de proteínas con una alta afinidad de unión por el esteroide claramente distinguible de la unión albúmina-esteroide encontrada en suero (11). La EGPA indicó que la proteína principal que une 5α DHT-³H se localizaba en las rebanadas No. 15 y 16, como se muestra en la Fig. 4 y otras dos proteínas con menor afinidad en las rebanadas No. 3, 9 y 10. En los patrones electroforéticos también se observó que en la muestra individual P₄, existe una mayor afinidad de la albúmina por la 5α DHT-³H con respecto a la que presentaron los otros "picos" de unión y en la poza esta afinidad de la albúmina disminuyó notablemente.

IIIE) EGPA para la Determinación de los Pesos Moleculares con Diferentes Concentraciones de Geles en Medio Alcalino.

Curva estándar de BSA para PM de proteínas.

En la Fig. 5, se presentan las bandas de BSA que resultaron de la EGPA en medio alcalino. Se obtuvieron cuatro bandas en el gel del 5% y 5 bandas en los geles al 7%, 7.7% y 9% de T.

En la Fig. 6 son mostradas las gráficas de Ferguson de los $\log R_f$ de las

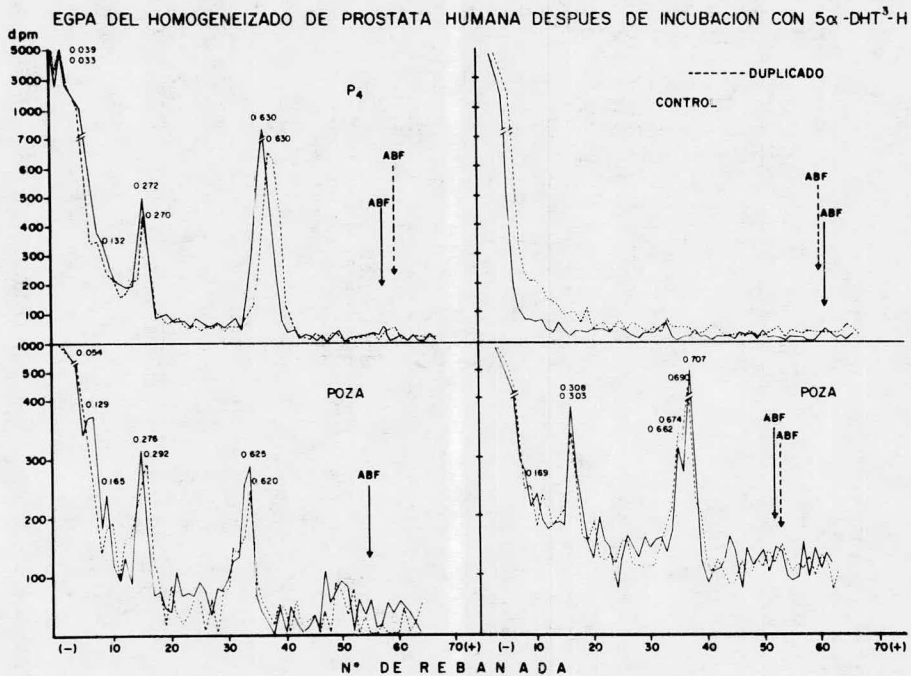


Fig. 4

Electroforesis alcalina de disco en gel de poliacrilamida al 7.7% de T de una muestra individual P_4 y una poza de homogeneizados in cubadas con 5α DHT- 3 H y tratada con una suspensión carbón-dextrán al 0.125% de cada una.

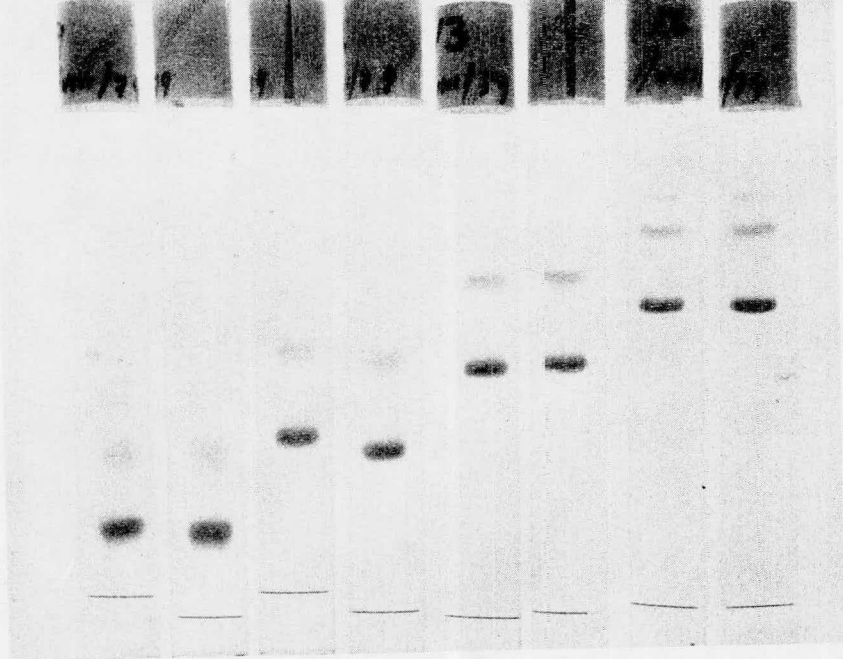


Fig. 5

Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de BSA, teñidos con Azul Brillante de Coomassie G 250 y desarrollados a diferentes concentraciones del gel (5%, 7%, 9% y 11%) para la obtención de la curva representada en la figura 6.

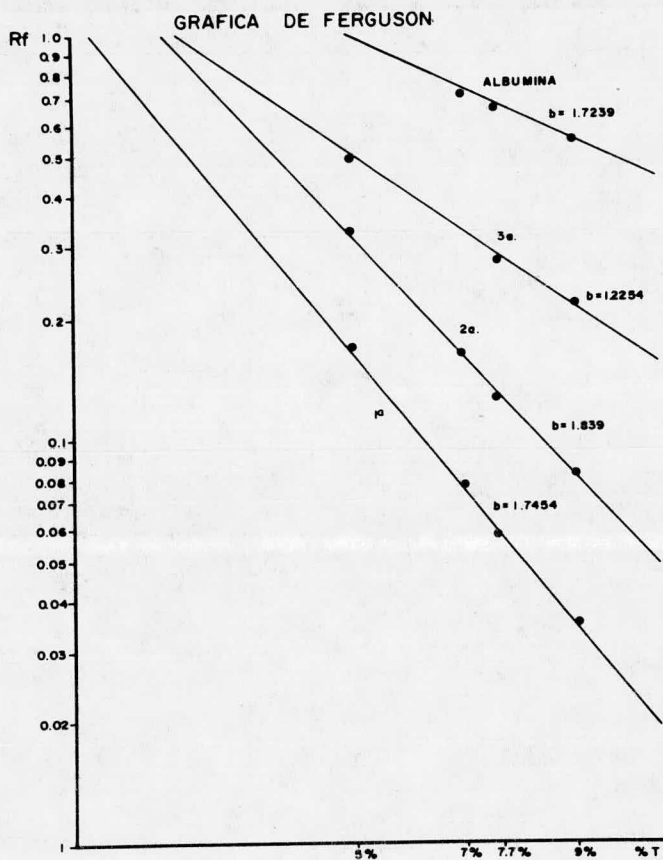


Fig. 6

Curva patrón de los log de las movilidades electroforéticas ($\log R_f$) de los agregados moleculares de albúmina sérica bovina (BSA) contra concentraciones variables de gel (curva de Ferguson). Albúmina: monómero; 3a, dímero; 2a, trímero; 1a. tetrámero.

bandas de BSA A₁-A₅ en función de la concentración del gel. La Tabla V muestra las cifras de las movilidades electroforéticas de los polímeros de BSA en EGPA a diferentes concentraciones de T y sus pendientes resultantes de las curvas de Ferguson.

TABLA V

% T BSA	R_f				
	5%	7%	7.7%	9%	m
A ₁	0.9222	0.6924	0.6601	0.5199	0.8797
A ₂	0.7317	0.4717	0.4045	0.3041	0.8238
A ₃	0.5933	0.3316	0.2705	0.1853	0.7460
A ₄	0.4879	0.2190	0.1655	0.0983	0.6881
A ₅	0.4064	0.1667	0.1220	0.0684	0.6275

La gráfica de la Fig. 7 muestra los valores de m en función de los PM mostrados en la Tabla VI.

TABLA VI

Proteína	Abreviatura	PM
BSA Monómero	A ₁	66,000
Dímero	A ₂	132,000
Trímero	A ₃	198,000
Tetrámero	A ₄	264,000
Pentámero	A ₅	330,000

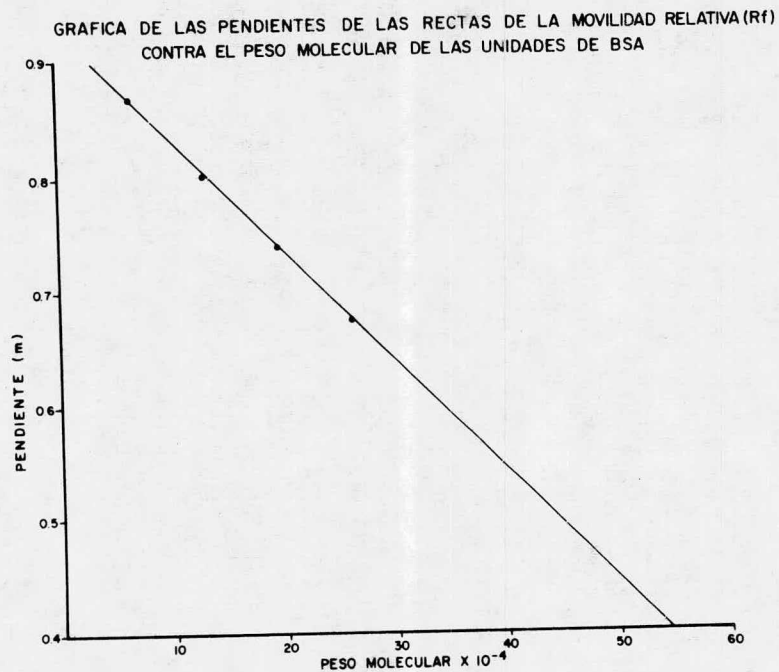


Fig. 7

Curva estándar para la estimación de los pesos moleculares de proteínas. Las ordenadas representan las pendientes obtenidas de las curvas de Ferguson (Fig. 6) y las abscisas, los pesos moleculares de los agregados moleculares de albúmina sérica bovina.

Determinación de los pesos moleculares de las proteínas que unen $5 \alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ del homogeneizado prostático.

Los resultados mostrados en la Fig. 8, son las tinciones de los geles de cada concentración (5%, 7%, 7.7% y 9% de T) de la EGPA alcalina, donde aparecen los desplazamientos cada vez mayores de las proteínas de la poza de homogeneizados a medida que disminuye el tamaño del poro del gel.

En los patrones electroforéticos de las proteínas que unen $5 \alpha\text{DHT-}^3\text{H}$, obtenidos de las EGPA alcalinas con 4 concentraciones diferentes de gel, se definieron 4 picos de unión de $5 \alpha\text{DHT-}^3\text{H}$, (Fig. 9) cuyos valores de R_f se resumen en la Tabla VII.

TABLA VII

% T	5%	7%	7.7%	9%	m
Pico de Unión					
10	0.1663	0.0761	0.0578	0.0348	0.6763
20	0.3253	0.1628	0.1277	0.0814	0.7072
30	0.4619	0.3127	0.2728	0.2117	0.8227
A1b	0.9089	0.7036	0.6541	0.5447	0.8798

De las gráficas de Ferguson representadas en la Fig. 10, se determinaron los valores de las pendientes de las curvas lineales, los cuales se interpolaron en la curva estándar de BSA (Fig. 7), para la obtención de los siguientes valores (Tabla VIII) de pesos moleculares para las proteínas que unieron $5 \alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en los sobrenadantes de homogeneizados de próstatas "normales" humanas.

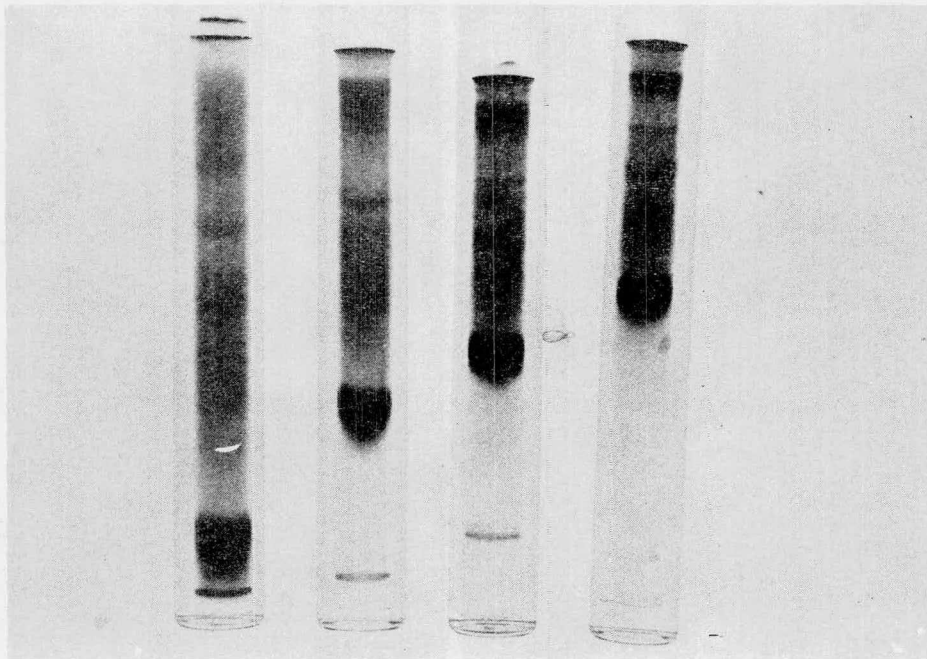


Fig. 8

Patrones electroforéticos teñidos de la poza de homogeneizados de próstatas "normales" humanas a concentraciones de 5%, 7%, 7.7% y 9% de acrilamida (% T).

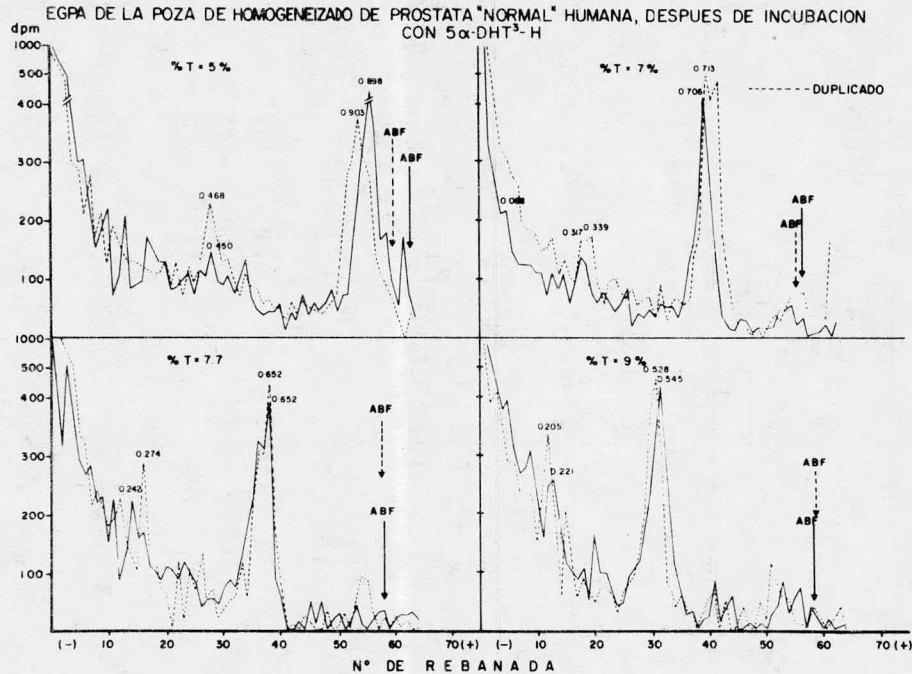


Fig. 9

Electroforesis alcalina de disco en gel de poliacrilamida a diferentes concentraciones de gel (5%, 7%, 7.7% y 9% de T) de la poza de homogeneizados de próstatas "normales" humanas, previamente incubadas con 5α DHT-³H y tratada con una mezcla de carbón-dextrán (0.125% de cada una).

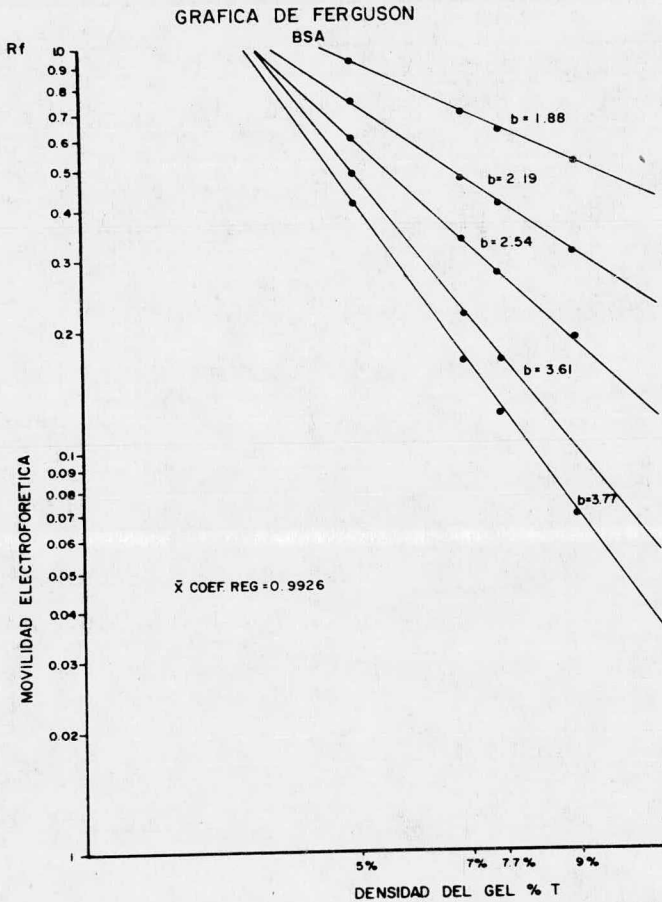


Fig. 10

Curva patrón de Ferguson construida con los log de las movilidades electroforéticas ($\log R_f$) de las proteínas que unieron 5 α DHT- 3 H en la poza de homogeneizados del tejido prostático "normal" humano a diferentes concentraciones de gel (5%, 7%, 7.7% y 9%). A: albúmina; B: tercera proteína; C: segunda proteína; D: primera proteína.

TABLA VIII

Pesos Moleculares de las Proteínas que unen 5α DHT- 3 H en los sobrenadantes de la Poza de Homogeneizados del Tejido Prostático "Normal" Humano.

Proteínas	Peso Molecular
Primera	276,102.0
Segunda	241,186.0
Tercera	110,678.0
Albúmina	65,542.0

IIIF) Estandarización de Proteínas para la Determinación de Pesos Moleculares con la Técnica de EGPA con SDS.

Para la obtención de la curva de PM de proteínas, utilizando la técnica de la EGPA al 10% de T y en presencia del detergente aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS), fueron utilizadas 7 proteínas con pesos moleculares ya caracterizados.

La Fig. 11 muestra la gráfica en papel semilogarítmico, de una curva uniforme de los PM de las proteínas conocidas contra sus movilidades electroforéticas, teniéndose en la Tabla IX los valores para la curva estándar de los pesos moleculares en EGPA con SDS al 10% de T.

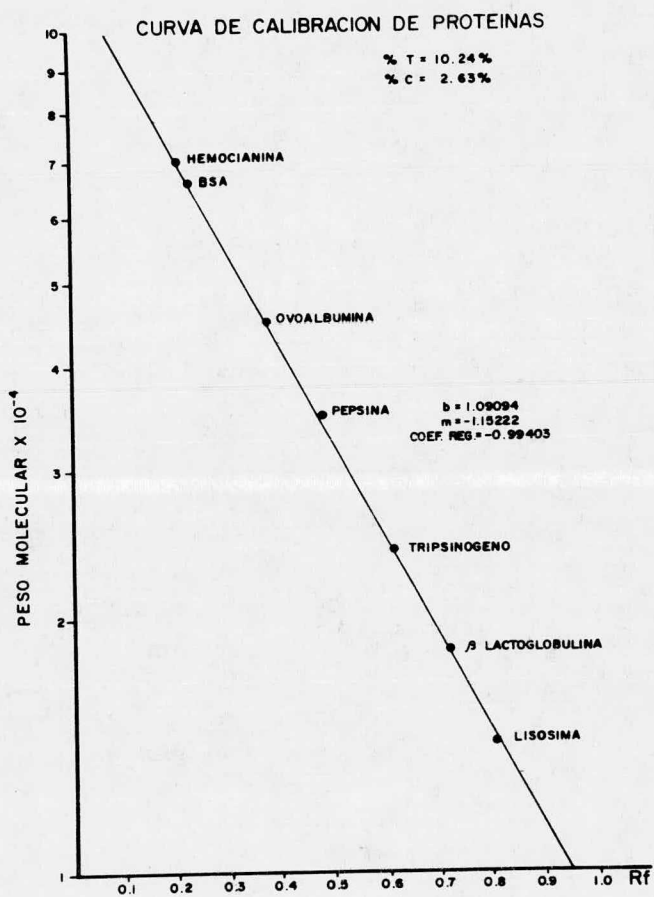


Fig. 11

Curva patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos desarrolladas en la electroforesis alcalina de disco con dodecil sulfato de sodio.

TABLA IX

Proteína	PM X 10 ⁻⁴	R _f
Hemocianina	7.00	0.2134
BSA Monómero	6.60	0.2356
Oroalbúmina	4.50	0.3799
Pepsina	3.47	0.4779
Tripsinógeno	2.40	0.6168
β-lactoglobulina	1.84	0.7170
Lisosima	1.43	0.8120

Los valores de los R_f obtenidos para las proteínas que unieron 5α DHT-³H después de la EGPA al 10% de T con SDS (Fig. 12) no se pudieron interpolar dentro de la curva estándar de proteínas por tener distancias de migración muy pequeñas en este sistema.

El ensayo anterior se realizó al 5% de T, con las proteínas estándares de la Tabla IX, la curva obtenida con los R_f de las bandas de los monómeros de las proteínas después de la EGPA con SDS al 5% (Fig. 13) es lineal pero lo que se intentó fue tratar de obtener una curva con los R_f de polímeros de estas proteínas para PM mayores de 10 x 10⁴. Los R_f obtenidos de estos polímeros dan una curva no lineal con la cual no se puede hacer una interpolación de los R_f de las proteínas desconocidas, no pudiéndose obtener ningún resultado de los pesos moleculares de estas proteínas que poseen un peso molecular mayor de 10 x 10⁴ con el método de EGPA con dodecil sulfato de sodio.

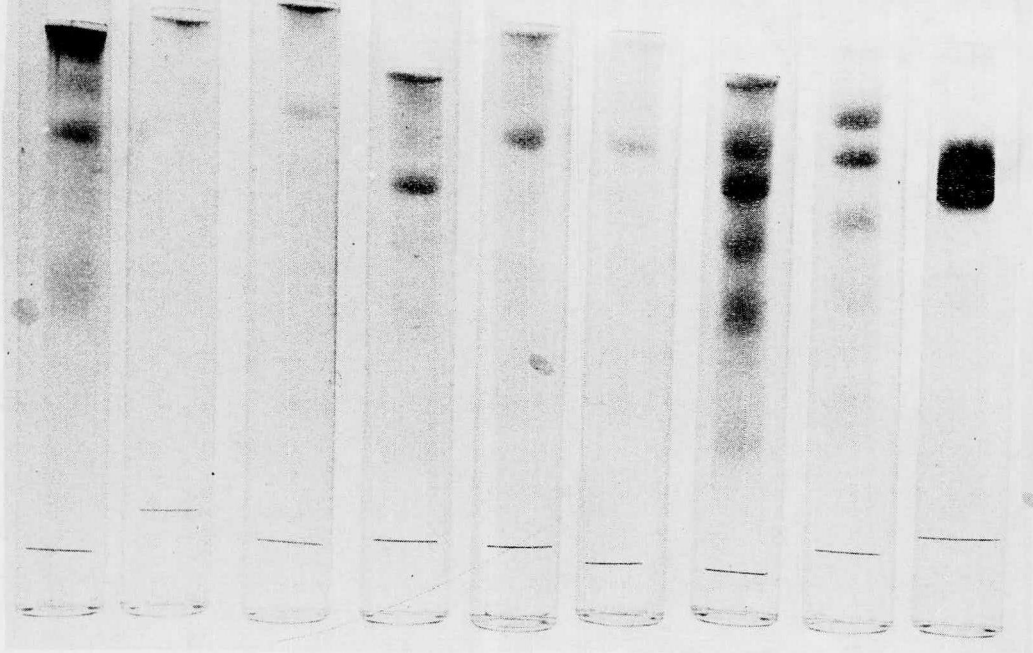


Fig. 12

Patrones electroforéticos (al 10% de T) teñidos de las proteínas de la poza de homogeneizados de próstatas "normales" humanas que unieron 5α DHT- 3 H, semipurificadas mediante la elución de las rebanadas de geles obtenidos en electroforesis previa.

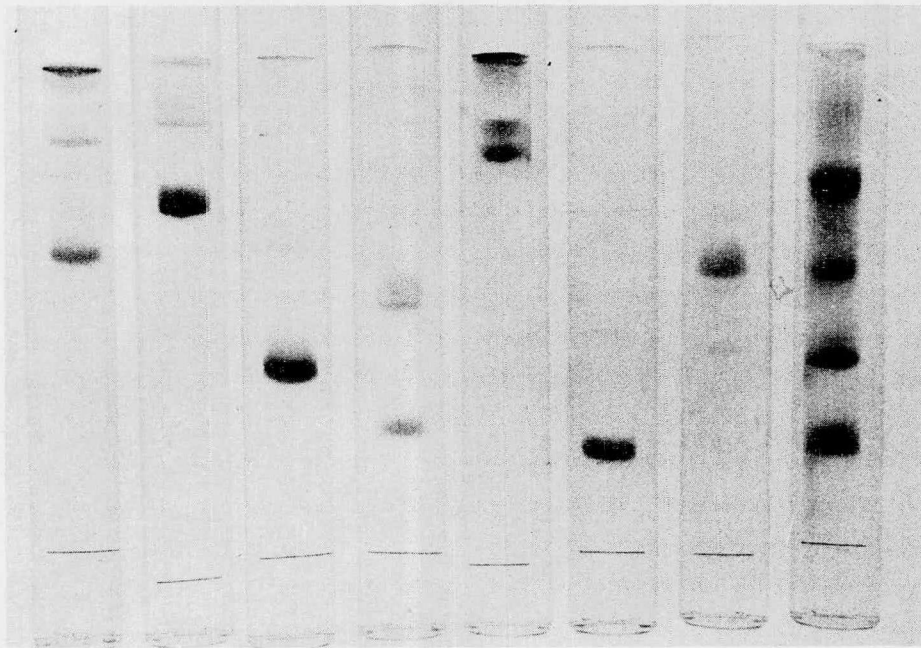


Fig. 13

Patrones electroforéticos teñidos desarrollados en electroforesis alcalinas con SDS al 5% de T de las proteínas semipurificadas de la poza de homogeneizados de próstatas "normales" humanas que unieron 5α DHT- 3 H.

CAPITULO IV

DISCUSION

En el estudio de las muestras recolectadas de próstatas "normales" humanas, no fue encontrada ninguna correlación entre la edad del individuo, la concentración de proteínas totales/ μl y el porcentaje de unión de $5 \alpha\text{DHT-}^3\text{H}$; por ejemplo, las muestras P_4 , P_7 y P_{10} , pertenecientes a individuos con edades de 60, 40 y 30 años respectivamente, presentaron porcentajes de unión muy semejantes (Tabla III) y por otra parte las muestras que contienen 2.16 y 9.0 μg de proteína/ μl de homogeneizado, poseen ambas un porcentaje de unión del 22%.

En la determinación de las proteínas totales de los homogeneizados de próstatas "normales" humanas, se intentó utilizar el método de Lowry (24) pero no obstante que este método es sensible en el orden de microgramos y relativamente no afectado por ácidos nucleicos presentó variaciones en las lecturas de absorbancia de las alícuotas de una sola muestra tomadas a diferentes tiempos (Fig. 2), según reportes realizados por Groves, Davis y Sells (20), el método de Folin-Lowry, tiene las desventajas siguientes: es inexacto en presencia de sulfato de amonio, guanina, glicina y otros materiales biológicos y además la suma de color varía con diferentes proteínas, no siendo estrictamente proporcional a la concentración de las mismas. Debido a estos inconvenientes se utilizó para la determinación de proteínas totales el método reportado por Groves, cuyos resultados indican que con la selección adecuada de dos longitudes de onda (isoabsorbancia) en los límites de 2240 Å a 2400 Å se pueden medir cantidades hasta de μg de proteínas con adecuada exactitud, en presencia de

ácidos nucleicos. En síntesis, las ventajas que presenta este método son: la factibilidad de realizar determinaciones rápidas de concentraciones de proteínas de 5 a 100 μg ; permite el uso de cualquier sistema amortiguador excepto los que contengan grandes cantidades de compuestos que absorban la luz en la región señalada, elimina la absorción interferente debido a la presencia de ácidos nucleicos y permite el examen subsecuente de otras propiedades de la muestra, por ejemplo: radiactividad, actividad inmunológica, actividad enzimática, etc.

La identificación de un receptor de esteroides en un tejido depende de la demostración reproducible de una alta afinidad con niveles variables en capacidad de la proteína por el esteroide, siendo posible diferenciar las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas. Según Geller, Thomas y Albert (20), los receptores de andrógenos deben ser diferentes de la TeBG sérica (globulina con capacidad de unir testosterona y estradiol), sin embargo, algunos investigadores informan (21) que los "picos" de unión encontrados en electroforesis y gradientes de sacarosa por ultracentrifugación de la proteína que une específicamente $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en próstata humana con hipertrofia benigna eran similares a los encontrados en suero sanguíneo para la hormona sexual unida a globulina, no habiéndose determinado las características fisicoquímicas de estos complejos esteroide-proteína.

La electroforesis alcalina en gel de poliacrilamida de disco al 7.7% de T que se realizó a la poza de homogeneizados de próstatas "normales" humanas incubada con el esteroide radiactivo después del tratamiento con Carbón/Dextrán, con lo cual se eliminó la radiactividad no unida en forma específica evidenció la existencia de cuatro proteínas que unieron

$5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$, presentando algunas diferencias en sus propiedades fisicoquímicas como son el peso molecular y el R_f representadas en la Fig. 4, donde encontramos dos "picos" de unión con $R_f = 0.0578 \pm 0.0127$ y $R_f = 0.1277 \pm 0.006$, los cuales no presentaron ninguna semejanza en características fisicoquímicas con las proteínas plasmáticas que unen andrógenos, reportadas hasta la fecha; es obvio un tercer "pico" de unión que presenta una gran afinidad por la $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ con baja capacidad de unión y $R_f = 0.2728 \pm 0.0148$ (en gel al 7.7%) y de 0.3127 ± 0.009 en el sistema de electroforesis al 7% de T, siendo este último similar al R_f de 0.32 en este sistema para la TeBG sérica caracterizada por Hansson (22); Corvol (23) y corroborado en este laboratorio. El cuarto "pico" de unión encontrado con R_f de 0.6541 ± 0.013 correspondió a la albúmina plasmática revelando una alta capacidad de unión.

En el transcurso del estudio encontramos por un lado que a mayor tiempo de congelación de los homogeneizados, la afinidad de las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$, disminuyó notablemente y por otro, la afinidad de la albúmina para $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ se encontró disminuída en la poza de homogeneizados en relación con la muestra individual, por lo que suponemos que la centrifugación de 15,000 xg (11,000 rpm) aplicada a la poza eliminó partículas conteniendo gran cantidad de albúmina pudiéndose deber además a que al formarse la poza se uniformizó en menor cantidad de concentración de TeBG, albúmina, etc., presentes en las muestras individuales.

Los estudios realizados en EGPA para la determinación de pesos moleculares (24), confirmaron que es una metodología conveniente para nuestros propósitos, ya que pueden ser determinados los pesos moleculares de microcantidades de proteínas en una mezcla. Mediante este método se deter-

minó la relación entre los pesos moleculares y la movilidad electroforética, minimizando la diferencia de carga al utilizar estándares de series multiméricas de proteínas y geles de diferente tamaño de poro o tamiz. En la actualidad es difícil saber porqué las proteínas que difieren mucho en composición de aminoácidos y en consecuencia en sus puntos isoelectricos siguen un patrón general en este sistema, siendo una posible explicación que el efecto tamizante del gel, el cual es una función exponencial, contrarreste el efecto de la carga.

En la Fig. 5 se muestran las movilidades electroforéticas relativas de los agregados moleculares de BSA en EGPA en cuatro concentraciones diferentes de gel, determinándose por este método, los pesos moleculares de las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en el sobrenadante de los homogeneizados del tejido prostático "normal" humano, encontrándose entre pesos moleculares de 65,500 a 271,000, los cuales presentaron una relación lineal con las pendientes resultantes de las curvas de Ferguson.

El método reportada por Weber y Osborn (19), para la obtención de los pesos moleculares tiene como fundamento la ruptura de uniones, tales como puentes de H, mediante la unión de iones dodecil sulfato a las proteínas lográndose así la separación de las proteínas desnaturalizadas en electroforesis en gel de poliacrilamida, asumiéndose que la carga individual inherente a cada proteína fue totalmente cambiada por la unión de aniones del SDS, volviendo todas las moléculas con carga negativa. La electroforesis en gel-SDS al 10% y 5% dió excelentes resultados para proteínas de pesos moleculares entre 15,000 y 70,000 (Fig. 11 y 12). La dificultad se presentó al tratar de determinar en las proteínas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ con pesos moleculares mayores siendo los valores de R_f bajos

a este pH, y desnaturalización de estas proteínas. Para obtener los pesos moleculares de las proteínas que unen 5α DHT- 3 H, se efectuó previamente una semipurificación de estas, en EGPA alcalina a pH 8.3, en la cual estas proteínas no perdieron su actividad (capacidad de unión). Mediante este procedimiento fueron obtenidos resultados positivos, las proteínas separadas, una vez eluidas de sus respectivas rebanadas del gel y liofilizadas fueron desarrollados nuevamente en EGPA al 10% y 5% de T con SDS. Estas proteínas debido a sus pesos moleculares elevados y tal vez al pre-tratamiento utilizado (concentración de sales, debido a la liofilización), presentaron una gran resistencia de migración en este sistema por lo que se infiere que para la aplicación del método EGPA-SDS en la determinación de los pesos moleculares de las proteínas que unen 5α DHT- 3 H es necesario encontrar un tratamiento más adecuado para la purificación de las proteínas del tejido prostático "normal" humano con la utilización de estándares de BSA (dímero, trímero, tetramero, etc.) en gels al 5% de T o patrones de proteínas con pesos moleculares mayores de 70,000.

CONCLUSIONES

Para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas específicas que unen $5\alpha\text{DHT-}^3\text{H}$ en homogeneizados de próstata "normal" humana, es conveniente realizar una purificación de ellas, con eliminación de la albúmina plasmática puesto que su interferencia es muy elevada, por ser una proteína inespecífica con gran capacidad de unión.

Con la utilización de la EGPA fue factible obtener las diferencias en los R_f de las proteínas que unen esteroides y determinar los pesos moleculares utilizando diferentes concentraciones de geles, siendo un procedimiento confiable para la caracterización preliminar de los componentes protéicos de una mezcla, dentro de amplios límites de pesos moleculares.

La EGPA con dodecil sulfato de sodio puede ser usada con confiabilidad para una gran variedad de proteínas con pesos moleculares entre 15,000-70,000, siendo principalmente adecuado para el cálculo de pesos moleculares de proteínas individuales.

ABREVIATURAS GENERALES

Abs	Absorbancia
ABF	Azul de bromofenol
Ae	Actividad específica
b	Intersección con el eje de las ordenadas
C	Entrecruzamiento (N,N'-Metilen-diacrilamida)
Ci	Curies
C/D	Suspensión de Carbón-Dextrán
cpm	cuentas por minuto
CR	Coefficiente de Regresión
DO	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
E	Eficiencia
EGPA	Electroforesis de disco en gel de poliacrilamida
f.i.	Frente iónico
x g	Fuerza gravitatoria
log	Logaritmo
LV	Luz visible
λ	Longitud de onda
m	Pendiente
mA	Miliamperios
n	Control radiactivo tratado con carbón
nm	Nanometro (10^{-9} metros)
P	Homogeneizado de tejido prostático "normal" humano
PM	Peso molecular
R	Referencia

R_f	Movilidad relativa
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
T	Acrilamida
t	Control radiactivo sin tratamiento con carbón
μg	Microgramos (10^{-6} gramos)
μl	Microlitros (10^{-6} litros)
UV	Luz ultravioleta
\bar{X}	Promedio

B I B L I O G R A F I A

1. Hafez, E.S.E. Human Semen and Fertility Regulation Man. Saint Louis, U.S.A. The C.V. Mosby Company. 1976.
2. Baulieu, E., Bricaire, H., Leprat, J. Glándulas Endocrinas. Patología Médica. España. 1972.
3. Unhjem, O. Binding of Androgen to Components of Rat Ventral Prostate Nuclei In Vitro. Acta Endocrinol (Kbh) 63: 69-78, 1970.
4. Tveter, K.J. An Autoradiographic Study on the Localization of Androgen in the Prostate Gland and the Seminal Vesicles of the Male. Acta Endocrinol (Kbh) 63: 207-15, 1970.
5. Thomas, J.A. et al. Subcellular Distribution of Radioactivity in the Prostate Gland Following the Single Injection of 1,2,-³H Testosterone. Acta Endocrinol (Kbh) 63: 505-11, 1970.
6. Hanson, V. et al. Androgenic Receptors in Human Benign Nodular Prostatic Hyperplasia. Acta Endocrinol (Kbh) 68: 79-88, 1971.
7. Farnsworth, W.E. Uptake of Plasma Androgens by Human Benign Hypertrophic Prostate. Invest. Urol. 8: 367-72, 1971.
8. Mainwaring, W.I.P. et al. Characterization of the Specific Androgen Receptors in the Human Prostate Gland. J. Endocrinol. 57: 371-84, 1973.
9. Attramadal, A. et al. Androgen Binding and Metabolism in the Human Prostate. Vitamin Horm. 33: 247-64, 1975.
10. Bourne, G.H., Danielli, J.F. Cellular Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones. Shutsung Liao. Academic Press Vol. 41, 1975.

11. Corvol, P.L., Chrambach, A., Rodbard, D., Bardin, C.W. Physical Properties and Binding Capacity of Testosterone-Estradiol-Binding Globulin in Human Plasma. Determined by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 246: 3435-43, 1971.
12. Lehninger, L. A. *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. 2ed. New York, 1976.
13. McGuinness, E.T. Estimation of Protein Size, Weight and Asymetry by Gel Chromatography. *J. Chemical Education*. Vol. 50, 12, 826-830, 1973.
14. Maurer, R.H. *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. New York, pp. 8-20, 1971.
15. Swaan, J. *Anal Biochem* 21, 155, 1967.
16. Atanasov, N.A., GiKov, D.G. Disc Electrophoresis of Prostatic Fluid. Relative Mobility and Molecular Weight of Some Enzymes and Proteins. *Clin. Chem. Acta* 36: 213-221, 1972.
17. Chrambach, A., Rodbard, D. Polyacrylamide Electrophoresis. *Science* 172: 440-451, 1971.
18. Shapiro, L.A., Maizel, V.J. Molecular Weight Estimation of Polypeptides by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Further Data Concerning Resolving Power and General Considerations. *Analytical Biochemistry* 29: 505-514, 1969.
19. Weber, K., Osborn, M. The Realiability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 244, 16: 4406-4412, 1969.
20. Groves, E.W., Davis, E.F., Sells, H.B. Spectrophotometric Determination of Microgram Quantities of Protein Without Nucleic Acid Interferences. *Analytical Biochemistry* 22: 195-210, 1968.

21. Campbell, H., Garvey, J.S., Cremer, N.C., Sussdorf, D.H. *Methods in Immunology*. 2da. Edición. pp. 74-83, 94-104. New York, W.A. Benjamin Inc., 1970.
22. Davis, B.J. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 121/2, 404, 1964.
23. Blatter, D.P., Reithel, F.J. *Molecular Weight Determinations and the Influence of Gel Density, Protein Charges and Protein Shapes in Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. *Journal of Chromatography* 46: 286-292, 1970.
24. Lowry, H.O., Rosebrough, J.N., Parr, L.A., Randall, J.R. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. *J. Biol. Chem.* 193: 265-72, 1951.
25. Cunningham, G.R., Tindall, D.J., Means, A.R. *Differences in Steroid Specificity for Rat Androgen Binding Protein and the Cytoplasmic Receptor*. *Steroids* 33-3, 261-275, 1979.
26. Geller, J., Cantor, J., Albert, J. *Evidence for a Specific Dihydrotestosterone-Binding Cytosol Receptor in the Human Prostate*. *J C E & M* 41-5, 1975. San Diego, California.
27. Becker, H., Horst, H.J., Krieg, M., Steins Pand, Voight, K.D. *Uptake Metabolism and Binding of Various Androgens in Human Prostatic Tissue In Vivo and In Vitro Studies*. *Journal of Steroid Biochemistry* 6: 447-452, 1975.
28. Hansson, V., Ritzen, E.M., Weddington, S.C., McLean, W.S., Tindall D.J., Nayfeh, S.N., French, F.S. *Preliminary characterization of a binding protein for androgen in rabbit serum. Comparison with the Testosterone Binding Globulin (TeBG) in Human Serum*. *Endocrinology* 95: 690-700, 1974.