



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**NIVELES DE INMUNOGLOBULINA G, EN LECHE MATERNA
DE MADRES LACTANTES QUE ACUDEN AL HOSPITAL
BELÉN DE LAMBAYEQUE, SETIEMBRE - NOVIEMBRE 2016**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

BR. GILBER SOTERO ILATOMA FUSTAMANTE

PATROCINADOR:

Dr. PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO

LAMBAYEQUE – PERÚ

2017

... El BIÓLOGO en esencia soluciona problemas. Pedro J. Chimoy Effio.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DECANATO



TESIS

**NIVELES DE INMUNOGLOBULINA G, EN LECHE MATERNA
DE MADRES LACTANTES QUE ACUDEN AL HOSPITAL
BELÉN DE LAMBAYEQUE, SETIEMBRE - NOVIEMBRE 2016**

**PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. GILBER SOTERO ILATOMA FUSTAMANTE

PATROCINADOR:

Dr. PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO

LAMBAYEQUE – PERÚ 2017

... El BIÓLOGO en esencia soluciona problemas. Pedro J. Chimoy Effio.

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**NIVELES DE INMUNOGLOBULINA G, EN LECHE MATERNA DE
MADRES LACTANTES QUE ACUDEN AL HOSPITAL BELÉN DE
LAMBAYEQUE, SETIEMBRE - NOVIEMBRE 2016**

**PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. GILBER SOTERO ILATOMA FUSTAMANTE

APROBADO POR:

Blga: ADELA CHAMBERGO LLONTOP
PRESIDENTE

DR. LUIS EDMUNDO CHICOMA CHAQUI
SECRETARIO

MSc. JULIO CÉSAR SILVA ESTELA
VOCAL

Dr. PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO
PATROCINADOR

DEDICATORIA

A Fidel y Deidamia mis padres, por su apoyo incondicional y su esfuerzo diario para hacerme salir adelante. A mi Tía Claudina por ser un ejemplo para mí.

A Pedro Chimoy, por ser mi maestro, guía y un gran amigo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las bendiciones de cada día, por la hermosa familia que tengo y a los grandes amigos que puso en mi camino.

Al Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio, docente principal del departamento de Biología, por la oportunidad de desarrollar este trabajo, por ser un gran amigo, maestro, por el gran apoyo incondicional, confianza, paciencia, dedicación, esfuerzo, por todos los consejos brindados y experiencias compartidas que han permitido comprender la esencia de ser biólogo y camino de la investigación.

Lic. Guillermo Uceda Campos por su amistad, enseñanza, colaboración, paciencia, apoyo incondicional para desarrollar el presente trabajo.

Dr. Heber Silva Díaz, Laboratorio Investigación área de Parasitología del Hospital Regional de Lambayeque, por su amistad, su colaboración, paciencia y apoyo incondicional para terminar el presente trabajo.

Lic. Luis Miguel Serquen López, Laboratorio Investigación área de Biología Molecular del Hospital Regional de Lambayeque, por brindarme los medios necesarios para terminar el presente trabajo.

A Juan Enrique, gran amigo por su apoyo moral, incondicional, los buenos deseos a lo largo del presente trabajo.

A mis amigos Aldemir Flores, Jhonatan Córdova, Gustavo Mego, Nathaly Gómez, Juan Carlos Herrera, por todos los momentos buenos y malos compartidos a lo largo de la carrera dentro y fuera de la universidad. A todo el Código 2010 - I.

INDICE	Pág.
Resumen.....	06
Abstract.....	07
Introducción.....	08
Antecedentes bibliográficos.....	11
Materiales y métodos.....	14
Material.....	14
Biológico.....	14
De Laboratorio y reactivos.....	14
Para la electroforesis.....	14
Para análisis western blot.....	15
Métodos.....	16
Procesamiento de la muestra.....	16
Cuantificación de la proteína mediante método UV.....	16
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) de IgG.....	17
Detección y cuantificación de la inmunoglobulina G.	18
Western Blot de las Muestras L.	18
Análisis estadístico de datos.....	19
Resultados.....	20
Cuantificación de la Proteína Mediante Método UV.	20
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) de IgG.....	21
Detección y cuantificación de la inmunoglobulina G (IgG).....	24
Western blot de las muestras L.....	25
Discusión.....	26
Conclusiones.....	30
Recomendaciones.....	31
Referencias Bibliográficas.....	32
Anexo.....	38

FIGURAS

INDICE	Pág.
Figura N° 01.....	10
Figura N° 02.....	21
Figura N° 03.....	21
Figura N° 04.....	22
Figura N° 05.....	22
Figura N° 06.....	23
Figura N° 07.....	25
Figura N° 08.....	25

ANEXOS

INDICE	Pág.
Anexo N° 01.....	38
Anexo N° 02.....	39
Anexo N° 03.....	40
Anexo N° 04.....	43
Anexo N° 05.....	46

I. RESUMEN:

La leche humana es un líquido producido por la glándula mamaria, contiene nutrientes, proteínas, hormonas, factores de crecimiento, que la hacen nutricional e inmunológicamente apta para el neonato. Es considerada como la fuente principal de alimento, sino también como proveedora de alimentos en el proceso de adaptación y maduración en la vida extrauterina. La respuesta inmunológica de la madre frente a agentes infecciosos es importante en el embarazo y en la lactancia durante el desarrollo del neonato, la inmunidad a nivel sistémico se adquiere a través de la IgG transplacentaria y durante la lactancia, la transferencia de inmunoglobulinas A, G y M a través de la leche proporciona al recién nacido una inmunidad pasiva, mientras que su sistema inmunológico está madurando. Este estudio tiene como objetivo la identificación y cuantificación de proteínas e IgG de leche materna. Se analizaron 50 muestras de leche que las madres lactantes donaron voluntariamente para el presente trabajo, las proteínas totales fueron cuantificadas por espectrofotometría UV. La identificación de IgG mediante SDS-PAGE y western blot y su cuantificación con el programa Imagej. Se obtuvo un promedio de proteínas totales de 33.17 mg/mL, y un promedio de IgG de 0.82 mg/mL. El promedio de proteínas totales están en el rango reportado por otros investigadores, pero el promedio de la concentración de IgG fue mayor al reportado por otros estudios.

Palabras clave: leche materna; proteínas; glándula mamaria; Neonato, Inmunoglobulinas, IgG, electroforesis, inmunofijación, espectrofotómetro, Imagej.

ABSTRACT:

Human milk is a liquid produced by the mammary gland, contains nutrients, proteins, hormones, growth factors, which make it nutritional and immunologically suitable for the neonate. It is considered as the main source of food, but also as a food supplier in the process of adaptation and maturation in extrauterine life. The immunological response of the mother to infectious agents is important in pregnancy and lactation during the development of the neonate, systemic immunity is acquired through transplacental IgG and during lactation, the transfer of immunoglobulins A, G and M, through milk gives the newborn a passive immunity while his immune system is maturing. This study aims at the identification and quantification of proteins and IgG of breast milk. Fifty samples of milk that the nursing mothers donated voluntarily for the present study were analyzed, the total proteins were quantified by spectrophotometry UV. Identification of IgG by SDS-PAGE and western blot and its quantification with the Imagej program. A total protein average of 33.17 mg / mL and an IgG average of 0.82 mg / mL were obtained. Mean total proteins are in the range reported by other investigators, but the mean IgG concentration was higher than that reported by other studies

Keywords: breast milk; Proteins; Mammary gland; Neonate, Immunoglobulins, IgG, electrophoresis, immunofixation, spectrophotometry, Imagej.

II. INTRODUCCIÓN:

La leche humana es un líquido producido por la glándula mamaria de gran complejidad biológica, constituido por nutrientes que lo hacen nutricional e inmunológicamente apta para que el neonato, sea alimentado con ella en forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida (García R., 2011).

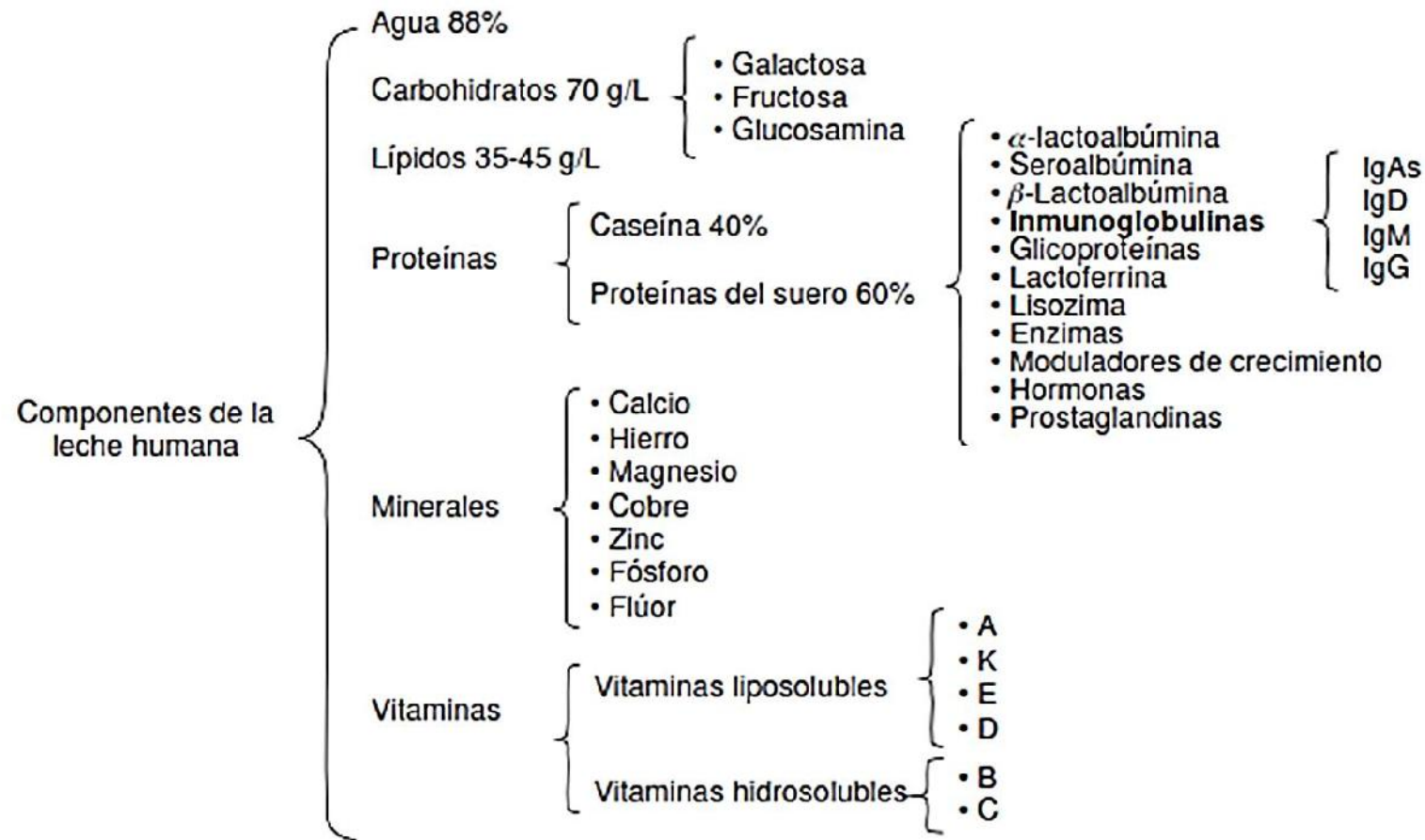
La leche humana contiene una serie de proteínas de defensa del neonato que parecen contribuir a la salud y el bienestar del neonato. Por su variabilidad entre los individuos no ha sido muy bien caracterizada (Broadhurst et al., 2015), contiene nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y moléculas de defensa para el neonato, anticuerpos (inmunoglobulina A, G y M) (Abbiati L. et al., 1997). Por su valor nutricional la leche es una fuente rica en proteínas bioactivas para el crecimiento y desarrollo del neonato (Liao et al., 2011), no solo debe ser considerada como la fuente principal de alimento, sino también como proveedora de reguladores o facilitadores en el proceso de adaptación y maduración a la vida extrauterina. Los anticuerpos son transferidos a través de la leche por lo que debe considerarse a la lactancia como la primera transferencia de inmunidad en forma pasiva brindando protección contra enfermedades alérgicas que induce a respuestas inmunes específicas de antígeno en el neonato (Calixto-Gonzales et al., 2011). Los neonatos sufren un alto riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas y respuestas inmunes deficientes por escasa interacción de madre – neonato durante la vida temprana (Verhasselt V. 2015).

Los cambios en el metabolismo materno y la respuesta inmunológica es afectada en el desarrollo del sistema inmunológico del recién nacido, la inmadurez del sistema inmunitario del neonato lo hace susceptible a las infecciones por virus y bacterias, la transferencia de anticuerpos a través de la placenta durante la vida uterina y luego a través de la leche materna después del nacimiento asegura la transferencia de inmunidad pasiva de madre a hijo. (Fujimori M., et al. 2015). La inmunidad a nivel sistémico se adquiere a través de la inmunoglobulina G transplacentaria, durante la lactancia la transferencia de inmunoglobulinas en la leche proporciona al recién nacido una inmunidad pasiva como la inmunoglobulina A, G y M (Rodríguez et al. 2010), mientras que su sistema inmunológico del neonato está madurando (Verhasselt V. 2015).

Las inmunoglobulinas son un componente importante en la actividad inmunológica se encuentran en calostro y leche, son transportadas a través de las células epiteliales mamarias por mecanismos mediados por receptores y transferida fuera de la glándula mamaria por eyección durante la lactancia, por la digestión se obtiene beneficio nutricional, a través de absorción en el sistema vascular y función inmunológica en el tracto gastrointestinal del recién nacido (Hurley W. & Theil P. 2011).

El foco de interés del presente trabajo fue determinar la concentración de la inmunoglobulina G presente en la leche materna que asegure la alimentación, desarrollo y la transferencia de inmunidad pasiva de madre a hijo durante la lactancia materna.

Figura N° 01: Componentes presentes en la leche materna



Calixto-Gonzales R. et al. 2011, Importancia clínica de la leche materna y transferencia de células inmunológicas al neonato, Perinatol Reprod Hum 25 (2).

III. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS:

Kulski J. & Hartmann P. (1981), determinaron la concentración de metabolitos (lactosa, glucosa y urea), electrolitos y proteínas (proteínas totales, alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, albúmina, IgA, IgG e IgM) en pequeñas muestras de secreción mamaria humana.

Solano L. & Torres L. (2013), determinaron las concentraciones de inmunoglobulinas G y M en la secreción mamaria en los cinco primeros días post-parto (calostro), siendo el valor promedio de las primeras 24 horas de inmunoglobulina G de 51.41mg/dL y hacia el quinto día disminuye paulatinamente a un promedio de 5.43 mg/dL.

Broadhurst M., et al. (2015), Realizaron un estudio para determinar la variabilidad, efecto y abundancia de cinco proteínas (lactoferrina, IgA secretora, IgG, componente secretora, y complemento C3), de defensa del huésped (feto) en leche durante la gestación. Los resultados obtenidos sirvieron de base para proporcionar una mejor defensa natural contra la infección en los lactantes prematuros.

Veloná T, et al. (1999), cuantificaron de diferentes proteínas de la leche humana en diferentes días durante la lactancia, electroforéticamente y midieron lactoferrina (LF), α -lactoalbúmina, β -caseína, y la lisozima en la leche de las madres que alumbran a término (TM) y prematuramente (PM).

Hsu et al. (2014), investigaron los cambios en la composición de la leche materna de madres con recién nacidos prematuros (<35 semanas de gestación) y leche materna de madres de los bebés a término (> 37 semanas de gestación), las muestras de leche fueron recolectadas entre la 1ª semana y cuarta semana. No se detectaron significativas en la mayoría de los componentes de la leche materna entre el término y prematuro.

Hurley W. & Theil P. (2011), analizaron diversos aspectos de las inmunoglobulinas en las secreciones mamarias (estructura, función, concentración, fuentes de origen, transporte, diferencias entre especies, y funciones de las inmunoglobulinas) y los rasgos relacionados con métodos de estabilidad y procesamiento de inmunoglobulinas obtenidas de leche.

Gasparoni A., et al. (1992), evaluaron la transferencia materno-fetal de anticuerpos totales y específicos de las subclases de IgG contra 14 antígenos polisacáridos capsulares de pneumococos y los mismos anticuerpos con leche de las madres que estaban amamantando a sus bebés.

Lindemann P., et al. (2003), investigó las características de la leche y estado serológico de las madres que donan leche negativas para

citomegalovirus (CMV), el VIH y hepatitis B y C a un banco de leche con el fin de prevenir una infección viral grave.

Díaz V. & Ramírez A. (2005), realizan una breve revisión bibliográfica de ventajas de la leche materna para el niño prematuro y el malnutrido.

Bernal C. (2009), purificó inmunoglobulina G a partir de una mezcla de proteínas presentes en suero de leche bovina usando cromatografía de exclusión molecular con fase estacionaria Sephadex 75 y fase móvil Tween 20 al 10% (v/v) en buffer fosfato salino (PBS). Con un rendimiento de 0.6 mg/mL de leche.

Konecny J., et al. (1994), determinaron que las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo covalente, para separarlas se utilizó 2-mercaptoetanol obteniendo cadenas ligeras (bajo peso molecular) de aproximadamente 25kD y cadenas pesadas (elevado peso molecular) de aproximadamente 50kD.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1. MATERIAL:

4.1.1. Biológico:

El material biológico constituye muestras de 1mL de leche que las madres lactantes (Primigestas y Multigestas) que donaron voluntariamente para la presente investigación y que previamente fueron informadas de la naturaleza y fines del presente trabajo

4.1.2. De laboratorio y reactivos:

- Centrífuga.
- Viales estériles
- Cámara electroforética
- Refrigerador
- NaCl al 0.9%

Para la electroforesis:

- Poliacrilamida – Bisacrilamida, SIGMA
- SDS 10%, SIGMA
- TEMED, MERCK
- APS, MERCK
- Tris- HCl 3M pH 8.9
- Tris- HCl 1M pH 6.8
- Buffer Tris – Glicina – SDS

- Solución colorante: coomassie blue R-250 50mg, TCA 7.5g, Metanol 50mL, Ac. Acético 17.5mL, Agua destilada 200mL.
- Solución decolorante: Metanol 25mL, Ac. Acético 5mL, Agua destilada 70mL.

Para análisis Western Blot

- Tris base 25mM
- Glicina 192mM
- SDS 0.1%
- Etanol absoluto 20%
- Rojo de Ponceau
- Ácido acético 5%
- Tween x – 20
- Triton x – 100
- NaCl 150mM
- Anticuerpo primario anti - Ig G
- Anticuerpo secundario anti- anti Ig G.
- Leche en polvo desnatada
- Membrana de Nitrocelulosa

4.2. MÉTODOS:

En este trabajo de investigación se ejecutaron los siguientes procedimientos:

4.2.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

Las muestras fueron recolectadas en viales estériles de 2mL, codificadas como M y trasladada en condiciones asépticas al laboratorio de bioquímica de la UNPRG, donde fueron diluidas 5 veces con cloruro de sodio (0.9%) y centrifugadas a 6000 rpm en una centrifuga GZ (velocidad Max. 10000 rpm) por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado para eliminar la grasa, codificado como L y guardado a 4°C para análisis posterior.

Se recolectaron 50 muestras durante todo el periodo de muestreo

4.2.2. Cuantificación de la proteína mediante método UV:

Las proteínas de la leche fueron cuantificadas por espectrofotometría UV 260 -280nm en un espectrofotómetro UNICO, se colocó 2 cubetas de cuarzo, en la cubeta blanco (B) 2mL de agua destilada pura y 20 μ L de cloruro de sodio para calibrar el espectrofotómetro a 0.000 de absorbancia y en la cubeta muestra (L) se agregó 2mL de agua destilada pura y 20 μ L de cada filtrado (L). A seguir equipo automáticamente muestra la cantidad de proteínas presentes en μ g/mL. Luego se hicieron las conversiones a mg de proteínas por 1mL de leche materna (mg/mL).

4.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) de IgG:

Las muestras de proteínas fueron analizadas en gel de poliacrilamida discontinua (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Weber y Osborn, adaptado por Chimoy et al. 1989 (anexo 03): Se realizaron utilizando una cámara electroforética de vidrio (12 cm de largo, 10 cm de ancho, con un peine de 1mm de espesor con 12 hendiduras (pozos) de 30 μ L c/u). En los 2/3 de la cámara inferior se preparó el gel de separación (Acril: Bisacril - 12%), después de añadir los agentes polimerizantes TEMED y persulfato de amonio se aguardó 10 minutos hasta que polimerizo, luego se añadió el gel de corrida (Acril: Bisacril - 5%) adaptándose el peine para formar las hendiduras donde se aplicaron los filtrados (L) a analizar. Así, mismo para estimar el peso molecular se utilizó un estándar de Inmunoglobulina G (10 μ L = 10 μ g), también se aplicó 20 μ L de un estándar de proteínas de pesos moleculares de amplio rango: (97.4 -14.4kDa) y los filtrados de leche L (30 μ g de proteína), la cámara electroforética fue conectada a una fuente poder a 50mA dejándose correr las muestras por 2 horas y 30 minutos aproximadamente. Terminada la corrida electroforética la cámara fue desconectada, el gel fue retirado y lavado con agua destilada y luego teñido por inmersión en una solución de commassie blue R-250 (0.25%) por 3 horas, luego desteñidos en una solución decolorante (Metanol, Ac. Acético, Agua Destilada).

4.2.4. Detección y cuantificación de la inmunoglobulina G (IgG):

Para detectar y cuantificar las bandas de IgG, el gel mostrando las bandas se pasó por un scanner (hp scanjet 2400), la imagen obtenida fue analizada para determinar el peso molecular de la proteína correspondiente a la IgG en la muestra de leche y corroborar con el estándar de la fracción de la cadena pesada. El peso molecular fue estimado confeccionando una curva estándar en papel de escala semilogarítmica, en el eje Log se anotaron los pesos moleculares y en eje de las abscisas la distancia recorrida por la proteína estándar en la electroforesis. El peso molecular de una proteína desconocida se extrapoló a partir de la distancia recorrida y su intersección en la recta. Este peso molecular debe ser aproximadamente el mismo que el patrón de cadena pesada de IgG. Para la cuantificación de la IgG se utilizó el programa informático Imagej v. 1.46. Para confirmar la naturaleza de IgG se realizó western blot.

4.2.5. Western blot de las muestras L:

El western blot fue realizado usando un equipo de Bio Rad en el laboratorio de investigación del Hospital Regional de Lambayeque. Se preparó un gel de SDS – PAGE como ya descrito, luego se aplicaron muestras (filtrados L) seleccionadas al azar de entre las 50 muestras totales y un patrón de proteínas preteñido de pesos moleculares de amplio rango: 260 – 10kDa, luego se conectó a una fuente poder de la marca Bio Rad. Terminada la corrida las proteínas separadas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa de

acuerdo al protocolo de Bio Rad. Las IgG transferidas a la membrana de nitrocelulosa fueron reveladas con el Kit para detección de anticuerpos de acuerdo al procedimiento descrito en el anexo 04. Finalmente las membranas fueron escaneadas y registradas

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS:

Los datos obtenidos fueron analizados con Microsoft Excel 2013 mediante las herramientas, Tablas, e imágenes en formato Power point.

V. RESULTADOS:

5.1. Cuantificación de la proteína mediante método UV

Las proteínas de la leche (usado 20 μ l del filtrado) fueron cuantificadas por espectrofotometría UV 260 - 280nm, el equipo está programado para mostrar el resultado en μ g/mL de proteína analizada. La concentración de cada muestra fueron anotadas en una hoja Excel (tabla N° 01) haciendo las conversiones a mg de proteínas para un mL de leche materna (mg/mL) (Anexo N° 01). Se obtuvo un máximo de **91.92 mg/mL**, un mínimo de **14.12mg/mL** y un promedio de **33.17 mg/mL**.

TABLA N° 01: Cuantificación de proteína mediante método UV 260-280nm.

Muestra	[Prot] mg/ml	N° de hijos	Muestra	[Prot] mg/ml	N° de hijos
M1	49.54	Multigesta	M26	30.06	Primigesta
M2	27.56	Primigesta	M27	23.6	Multigesta
M3	32.73	Primigesta	M28	20.13	Primigesta
M4	37.01	Primigesta	M29	31.53	Multigesta
M5	31.26	Multigesta	M30	41.38	Primigesta
M6	31.49	Multigesta	M31	17.11	Primigesta
M7	50.05	Primigesta	M32	18.33	Primigesta
M8	17.27	Multigesta	M33	34.32	Primigesta
M9	32.53	Multigesta	M34	29.76	Multigesta
M10	60.18	Primigesta	M35	54.18	Multigesta
M11	39.95	Multigesta	M36	14.12	Multigesta
M12	20.99	Multigesta	M37	91.92	Primigesta
M13	58.29	Primigesta	M38	15.73	Primigesta
M14	41.07	Multigesta	M39	34.28	Multigesta
M15	55.05	Primigesta	M40	25.2	Primigesta
M16	22.39	Multigesta	M41	47.67	Multigesta
M17	23.69	Primigesta	M42	33.76	Multigesta
M18	36.65	Multigesta	M43	38.12	Multigesta
M19	38.21	Primigesta	M44	20.46	Multigesta
M20	46.04	Multigesta	M45	14.89	Multigesta
M21	18.51	Multigesta	M46	21.26	Multigesta
M22	46.43	Multigesta	M47	16.39	Primigesta
M23	32.43	Primigesta	M48	14.94	Multigesta
M24	18.03	Primigesta	M49	33.32	Primigesta
M25	53.36	Multigesta	M50	15.35	Primigesta

* Multigesta: Madre con más de un hijos

5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) de IgG:

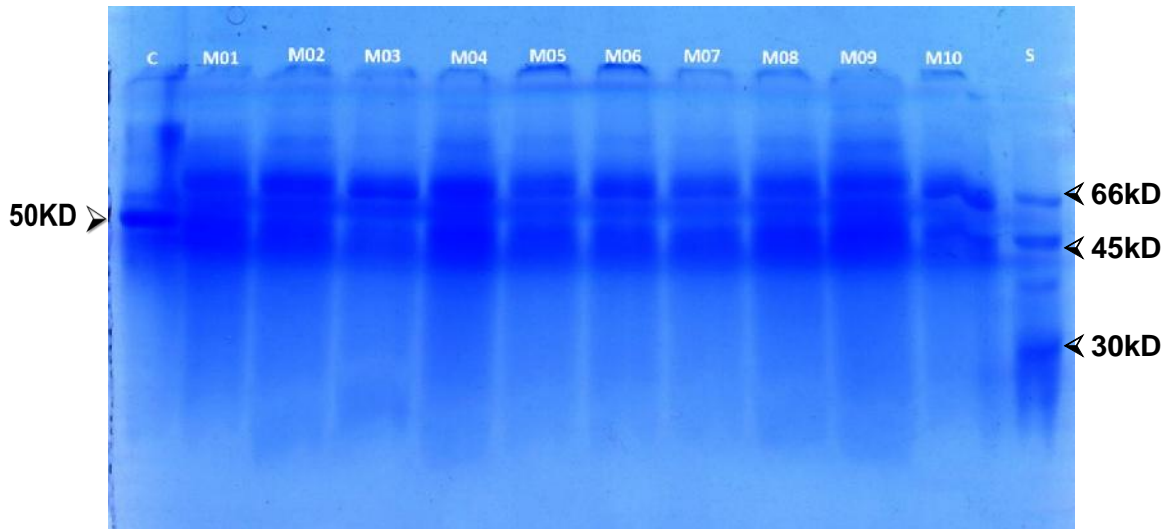


Figura 01: Muestras analizadas en SDS-PAGE al 12%, **C:** control de Inmunoglobulina G con un peso molecular aproximado de 50KD indica la presencia de Ig G., **M01 – M10** muestras de leche materna, **S:** estándar de pesos moleculares de amplio rango.

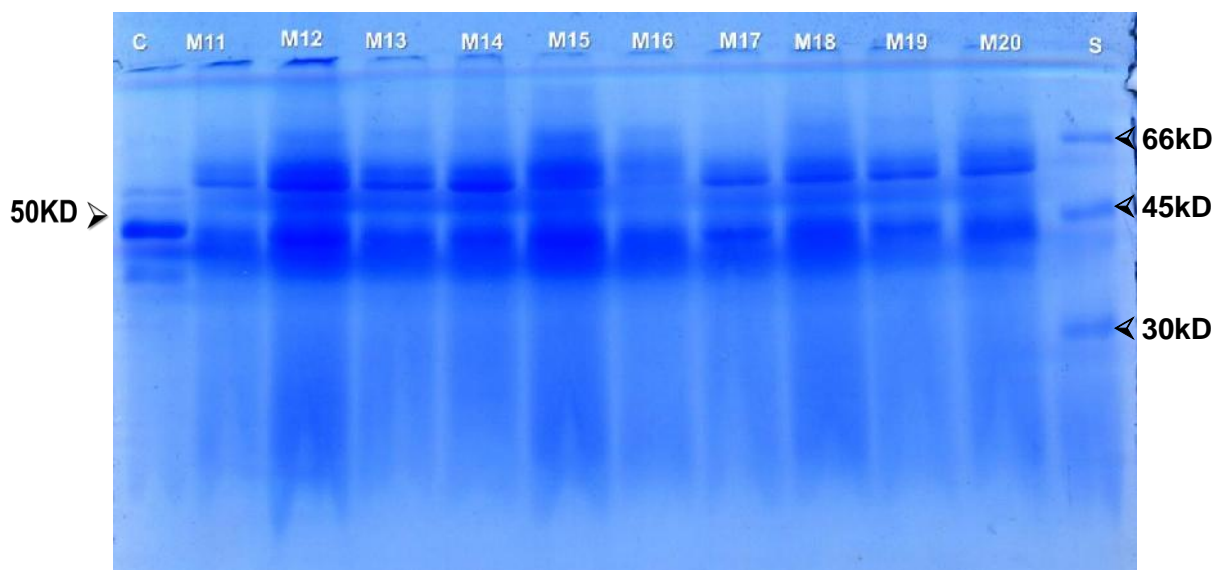


Figura 02: Muestras analizadas en SDS-PAGE al 12%, **C:** control de Inmunoglobulina G con un peso molecular aproximado de 50KD indica la presencia de Ig G., **M11 – M20** muestras de leche materna, **S:** estándar de pesos moleculares de amplio rango.

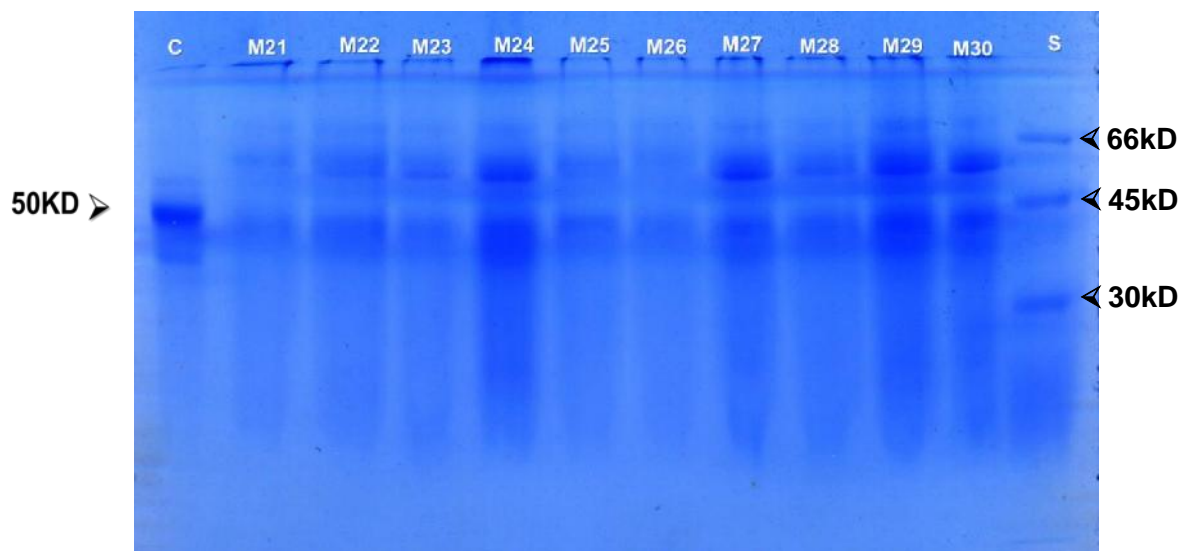


Figura 03: Muestras analizadas en SDS-PAGE al 12%, **C:** control de Inmunoglobulina G con un peso molecular aproximado de 50KD indica la presencia de Ig G., **M21 – M30** muestras de leche materna, **S:** estándar de pesos moleculares de amplio rango

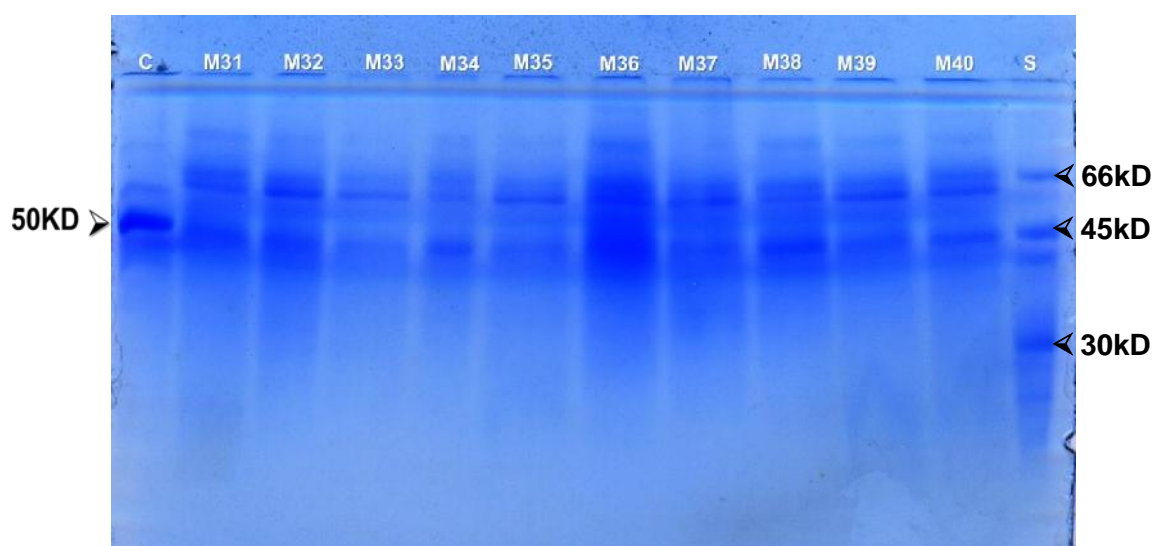


Figura 04: Muestras analizadas en SDS-PAGE al 12%, **C:** control de Inmunoglobulina G con un peso molecular aproximado de 50KD indica la presencia de Ig G., **M31 – M40** muestras de leche materna, **S:** estándar de pesos moleculares de amplio rango

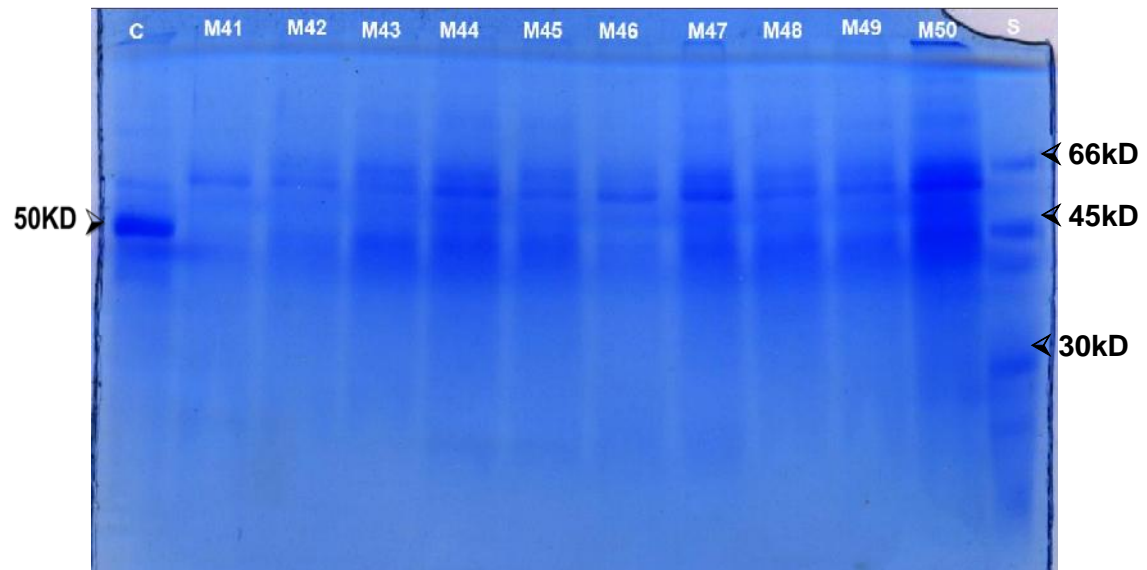


Figura 05: Muestras analizadas en SDS-PAGE al 12%, **C:** control de Inmunoglobulina G con un peso molecular aproximado de 50KD indica la presencia de Ig G., **M41 – M50** muestras de leche materna, **S:** estándar de pesos moleculares de amplio rango

5.3. Detección y cuantificación de la inmunoglobulina G (IgG):

Para la cuantificación de la IgG se utilizó el programa informático Imagej v. 1.46. La concentración de cada muestra fue anotada en una hoja Excel (tabla N° 02) haciendo las conversiones correspondientes de cada una. Se obtuvo un máximo de **0.97mg/mL**, un mínimo de **0.72 mg/mL** y un promedio de **0.82 mg/mL**. (Anexo N° 02)

TABLA N° 02: Cuantificación de inmunoglobulina G utilizando el programa Imagej v. 1.46. (Anexo 05)

Muestra	[IgG] mg/mL	%*	Muestra	[IgG] mg/mL	%*
M1	0.78	1.58	M26	0.82	**
M2	0.78	**	M27	0.76	3.21
M3	0.77	**	M28	0.79	**
M4	0.79	**	M29	0.77	2.43
M5	0.82	2.62	M30	0.83	**
M6	0.77	2.44	M31	0.85	**
M7	0.82	**	M32	0.83	**
M8	0.84	4.88	M33	0.79	**
M9	0.79	2.44	M34	0.80	2.70
M10	0.93	**	M35	0.83	1.53
M11	0.84	2.11	M36	0.80	5.64
M12	0.80	3.81	M37	0.85	**
M13	0.78	**	M38	0.93	**
M14	0.78	1.91	M39	0.92	2.69
M15	0.76	**	M40	0.88	**
M16	0.82	3.67	M41	0.72	1.50
M17	0.90	**	M42	0.74	2.18
M18	0.82	2.25	M43	0.79	2.08
M19	0.87	**	M44	0.78	3.82
M20	0.86	1.86	M45	0.81	5.41
M21	0.97	5.22	M46	0.76	3.55
M22	0.78	1.69	M47	0.86	**
M23	0.73	**	M48	0.88	5.91
M24	0.79	**	M49	0.82	**
M25	0.88	1.65	M50	0.77	**

* Porcentaje correspondiente de la proteína total

** Madres primigestas

5.4. Western blot de las muestras L:

Se realizó western blot, para confirmar la naturaleza de IgG.

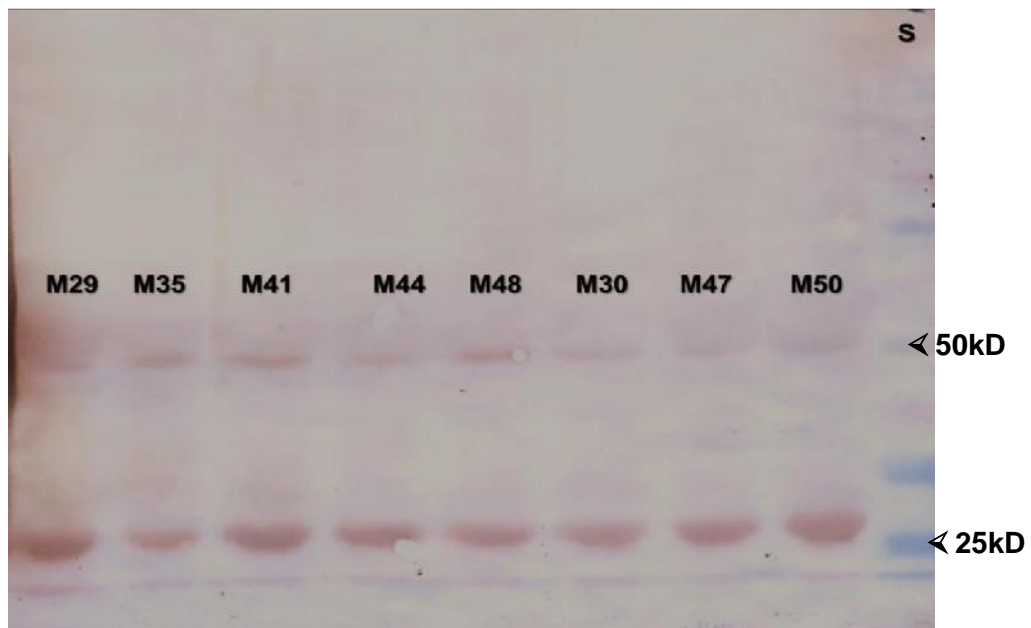


Figura 06: Muestras analizadas por western blot. De diferentes muestras de leche materna, mostrando dos bandas una de aproximadamente 50 kD (cadena pesada) y una de aproximadamente 25 kD (cadena ligera)

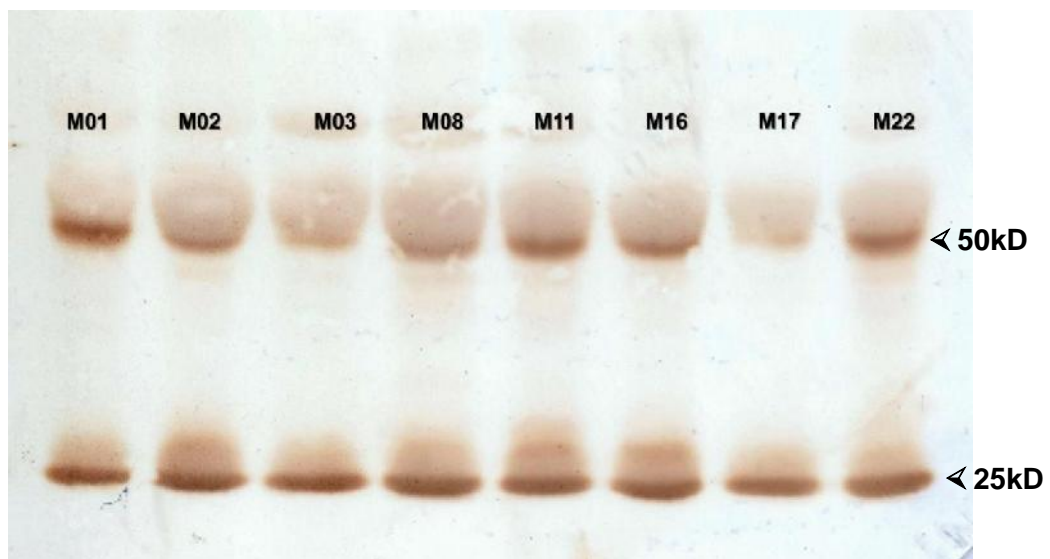


Figura 07: Muestras analizadas por western blot. De diferentes muestras de leche materna, mostrando dos bandas una de aproximadamente 50 kD (cadena pesada) y una de aproximadamente 25 kD (cadena ligera)

VI. DISCUSIÓN:

Las proteínas de la leche humana son uno de los principales contribuyentes en la primera infancia, son la principal fuente de aminoácidos necesarios para sintetizar las proteínas del cuerpo y facilitar la digestión de nutrientes, también proporciona moléculas inmunológicamente activas capaces de conferir protección pasiva contra los patógenos, estimular las defensas antimicrobianas del recién nacido o facilitar la maduración de las respuestas inmunológicas (Affolter M., et al. 2016).

Dentro de la valoración nutricional se ha reconocido que existe una amplia variabilidad en la concentración de proteínas en leche materna, la concentración promedio de proteínas de la población estudiada se encuentra entre los rangos reportados por otros grupos de investigación: se obtiene un promedio de 33.17mg/mL (tabla N° 01). Un valor mucho menor al reportado por otros investigadores en otras países del mundo: Fujimori M., et al. (2015), quienes obtuvieron un valor promedio de proteínas de 101.0 mg/mL (Brasil), Rodríguez M., et al. (2010) 52.5mg/mL (México). Nuestro promedio de proteínas fue mayor que los mostrados por: Ballard O., et al. (2013) 10.5mg/mL (USA), Ming D., et al. (2010) 15.8 mg/mL (China), Yu D., et al. (2011) 13.3mg/mL (China).

Las técnicas utilizadas por estos investigadores no solo detectan proteínas totales, sino además grupos reactivos derivados de componentes nitrogenados no proteicos presentes en la leche (urea, creatinina, amonio, factores de crecimiento, N-acetil azucres) que derivan del metabolismo de proteínas alimenticias y constituyen el 25% del nitrógeno total de la leche

materna, (Rodríguez M, et al. 2010). La cuantificación UV empleada en este trabajo es específica y sensible para proteínas, la única biomolécula interferente es el ácidos nucleico (ADN, ARN) por lo que fue necesario calcular un índice de absorción $280 - 260 \geq 1.9$

Rodríguez M., et al. (2010) la concentración de proteínas de la leche materna es poco influenciada por la dieta, mientras que para Fujimori M., et al. (2015), la variación en la concentración de leche materna pueden ser afectada por varios factores como: la dieta materna, el estado nutricional, la anemia materna, la hipertensión, la diabetes; estos factores pueden cambiar las características nutricionales e inmunológicas de la leche materna. Para Nommsen LA, et al. (1991) debe tenerse en cuenta que las madres que producen mayores cantidades de leche tienden a tener menor concentración de grasa y proteínas en la leche pero mayor concentración de lactosa.

La composición de la leche materna humana está influenciada por la raza, religión, cultura, dieta (Lönnnerdal et al., 1976; Annemiek, et al. 1994, Sala-Vila, et al. 2005, Yu D., et al. 2011). Las madres cuyas leches fueron analizadas en el presente trabajo viven en el norte del Perú en un clima semitropical, una cultura mixta, cuya alimentación está basada en consumo de pescado, pollo, carne, verduras. Esta alimentación determina la composición de la leche materna.

La identificación de IgG de la leche se realizó mediante técnicas electroforéticas de amplio uso SDS – PAGE y western blot, con anticuerpos específicos (anti. Ig G). El western blot es una técnica más sensible que de la técnica ELISA (Casais S., et al. 2016). La cuantificación de IgG se realizó

por el software imagej, programa de dominio público utilizado para el procesamiento y análisis de imágenes procedentes de microscopia, radiología y en general cualquier imagen obtenida de ensayo científico (Davidson et al. 2016, Martiel et al. 2015, Wang et al. 2014, Kurps et al. 2014, Lee I, et al. 2012, Wu J et al. 2003).

La cuantificación de IgG de leche materna, mostró un promedio de 0.82 mg/mL (tabla N° 02), cantidad mucho mayor que las mostradas por: Solano L. & Torres L., 2013 0.51mg/mL en las primeras 24 horas (Ecuador), Fujimori M., et al. (2015) 0.4mg/mL (Brasil), Palmeira P. & Corneiro M. (2016) 0.1mg/mL (Brasil), Gonzáles R., et al. (2011) 0.44mg/mL (México), Rodríguez M., et al. (2010) 0.02mg/mL (México), Yu D., et al. (2011) 0.46 mg/mL (China), Affolter M., et al. (2016) 0.22mg/mL (China). Este promedio de IgG encontrado en este trabajo, indica que la leche materna de madres lambayecanas difiere de las ya mencionadas.

Este resultado contradice a lo afirmado por Affolter M., et al. (2016), quienes afirman que la IgG es estable durante la lactancia materna.

La concentración de IgG en las muestras de leche materna analizadas no tiene un valor o un porcentaje constante, como se analiza a continuación, las muestras: M37 tiene 91.92 mg/mL de proteína total y 0.85 mg/mL (0.92%) de IgG, M21 con 18.12 mg/mL proteína total y 0.97 mg/mL (5.35%) de IgG y M05 con 31.26 mg/mL proteína total y 0.82mg/mL (2.62%) de IgG (Tabla N° 02). Este resultado revela que el organismo materno prioriza la defensa inmunológica del neonato, pues a pesar de tener bajas concentraciones de

proteínas totales, sin embargo el % correspondiente de IgG fue alto (M48 tabla N° 02).

Con respecto a la síntesis de la IgG podemos decir que la síntesis de la cadena pesada y la síntesis cadena ligera no son sintetizadas simultáneamente en una madre primigesta. Aparentemente primero se sintetizaría la cadena ligera (figura N° 06) lo que indicaría que no se asegura una transferencia pasiva adecuada de madre a hijo en los primeros días. No podemos indicar con que diferencia de tiempo se realiza la síntesis de las cadenas componentes, pero si hemos observado que en este caso la que se sintetiza primero es la cadena ligera.

Estos resultados permitirán elucidar el rol que desempeñan los diferentes factores (nutricionales, inmunológicos, hormonales, socioeconómicos, ambientales) en la lactancia materna, así como determinar el estado de la madre lactante.

VII. CONCLUSIONES:

1. Se obtuvo un promedio de proteínas totales de leche materna de **33.17 mg/mL**. Este promedio de proteínas está en el rango de lo reportado por otros investigadores.
2. Se separó e identificó la inmunoglobulina G de leche materna por SDS – PAGE y Western Blot: la cadena pesada de (50kD) y la cadena liviana de (25kD).
3. Se obtuvo un promedio de inmunoglobulina G de leche materna de **0.82 mg/mL**. Este promedio de Inmunoglobulina G fue mayor a lo reportado por otros estudios.

VIII.RECOMENDACIONES:

1. Cuantificar proteínas totales e inmunoglobulinas en madres lactantes de la región Lambayeque para generar banco de datos.
2. Esclarecer el tiempo de síntesis de la cadena pesada de la IgG.
3. Difundir estos resultados a los hospitales, centro de atención al neonato, la importancia de la leche materna como fuente nutricional y defensa del neonato.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Affolter, M., Garcia-Rodenas, C. L., Vinyes-Pares, G., Jenni, R., Roggero, I., Avanti-Nigro, O., Favre, L.** (2016). Temporal Changes of Protein Composition in Breast Milk of Chinese Urban Mothers and Impact of Caesarean Section Delivery. *Nutrients*, 8(8):504.
- Annemiek, C., Goedhart & Bindels, J. G.** (1994). The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: Recent findings and possible applications. *Nutrition Research Review*, 7:1–23.
- Ballard O. & Morrow A.** (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1):49–74.
- Bernal C.** (2009). Purificación de inmunoglobulinas de suero de leche por técnicas cromatografías. Facultad de Ciencia, Escuela de Química Universidad industrial de Santander.
- Broadhurst M., Beddis K., Black J., Henderson H., Nair A., Wheeler T.** (2015). Effect of gestation length on the levels of five innate defence proteins in human milk: *Early Human Development*, 91(1).
- Calixto-Gonzales R., Gonzales-Jiménez M., Bouchan-Valencia P., Paredes-Vivas Y., Vásquez-Rodríguez S., Cébulo-Vásquez A.** (2011), Importancia clínica de la leche materna y transferencia de células inmunológicas al neonato, *Perinatol Reprod Hum* 25 (2).
- Casáis S., Badía D., Martínez R., Delgado S., Peña I., Briones E., Poncela V.** (2016). Interferencias por terapia con anticuerpos monoclonales en electroforesis e inmunofijación de proteínas séricas. *Rev Lab Clin. Elsevier España*.

- Chimoy E, PJ; Lopez L, C; Mongirfo G, M.** (1989). Bioquímica y Biología Molecular: Manual de Prácticas. CONCYTEC - Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Davidson R, Liu Y, Gerien KS, Wu A-Q** (2016). Real-Time Visualization and Quantification of Contractile Ring Proteins in Single Living Cells. *Methods Mol Biol.* 1369: 9–23.
- Díaz V. & Ramírez A.** (2005), Lactancia materna: evaluación nutricional en el recién nacido. *Rev Cubana Pediatr*; 77(2).
- Etemadzadeh MH, Arashkia A, Roohvand F, Norouzzian D, Azadmanesh K** (2015). Isolation, cloning, and expression of *E. coli* BirA gene for biotinylation applications. *Adv Biomed Res.* 4:149.
- Fujimori, M., França, E. L., Fiorin, V., Morais, T. C., Honorio-França, A. C., & de Abreu, L. C.** (2015). Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 15:166.
- García-López R.,** (2011) Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatr Mex*; 32(4): 223 - 230
- Gasparoni, A., Avanzini, A., Ravagni Probizer, F., Chirico, G., Rondini, G., Severi, F.** (1992). IgG subclasses compared in maternal and cord serum and breast milk. *Archives of Disease in Childhood*, 67: 41–43.
- Grassly, Carolina Del Norte, Kang, G., Kampmann, B.** (2015). Biological challenges to effective vaccines in the developing world. *Philosophical Transactions de la Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1671).

- Guilherme F. Caetano, Marcio Fronza, Marcel N. Leite, Ary Gomes & Marco Andrey Cipriani Frade** (2016). Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis, *Pharmaceutical Biology*, 54:11, 2555-2559.
- Hurley WL. & Theil PK.** (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk, 3(4):442-474.
- Hsu YC, Chen CH, Lin MC, Tsai CR, Liang JT, Wang TM.** (2014). Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. *Journal: Pediatric Neonatology*, 55(6):449-454.
- Intarapanich A, Kaewkamnerd S, Shaw PJ, Ukosakit K, Tragoonrung S, Tongsima S** (2015). Automatic DNA Diagnosis for 1D Gel Electrophoresis Images using Bio-image Processing Technique. *BMC Genomics*.
- Järvinen, K. M., Westfall, J. E., Seppo, M. S., James, A. K., Tsuang, A. J., Feustel, P. J., Berin, C.** (2014). Role of maternal elimination diets and human milk IgA in development of cow's milk allergy in the infants. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(1):69–78.
- Khosravifarsani M, Monfared AS, Pouramir M, Zabihi E** (2016). Effects of Fenton Reaction on Human Serum Albumin: An In Vitro Study. *Electron Physician*, 8(9):2970-2976.
- Konecny J., Brown P., Scouten W.** (1994). Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *Journal of chromatography A* 673: 45 – 53.

- Kulski JK, Hartmann PE.** (2015). Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 59 (1): 101-114.
- Kurps J, Broeke JH, Cijssouw T, Kompatscher A, van Weering JR, de Wit H** (2014). Quantitative image analysis tool to study the plasma membrane localization of proteins and cortical actin in neuroendocrine cells. *J Neurosci Methods*, 236:1-10.
- Lee I-J, Coffman VC, Wu J-Q.** (2012) Contractile-ring assembly in fission yeast cytokinesis: recent advances and new perspectives. *Cytoskeleton* 69:751–763.
- Liao Y., Alvarado R., Phinney B., Lönnerdal B.** (2011). Proteomic Characterization of Human Milk Whey Proteins during a Twelve-Month Lactation Period. *J. Proteome Res*, 10 (4), pp 1746–1754.
- Lindemann P, Foshaugen I., Lindemann R.** (2003). Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank, Department of Paediatrics, Ullevål University Hospital, Oslo Norway.
- Lönnerdal, B., Forsum, E., & Hambraeus, L.** (1976). A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29:1127–1133.
- Martiel J-L, Leal A, Kurzawa L, Balland M, Wang I, Vignaud T, Tseng Q, Théry M** (2015). Chapter 15 – Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Biophysical Methods in Cell Biology*, Volume 125: 269–287.

- Ming D, Wei L, Yumei Z, Xiaoli W, Ai Z, Xiaohui Z, Peiyu W, Qing H.** (2010). Amino acid composition of lactating mothers' milk and confinement diet in rural North China. *Asia Pac J Clin Nutr*; 19:344-349.
- Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lonnerdal B, Dewey KG.** (1991). Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition*, 53(2):457–465.
- Palmeira P. & MAGdA C.** (2016). Immunology of breast milk. LIM-36, Departamento de Pediatria. *Rev Assoc Med brAs*, 62(6):584-593.
- Rodríguez M., Estela G., Vite L., Espinosa M.,** (2010). Valoración inmunológica y nutricia del calostro en mujeres de bajo nivel socioeconómico en Cuautla, Morelos, como una visión integral de la lactancia. *Pediatría de México* vol. 12 Núm. 1
- Sala-Vila, A., Castellote, A. I., Rodriguez-Palmero, M., Campoy, C., & López-Sabater, M. C.** (2005). Lipid composition in human breast milk from Granda (Spain): Changes during lactation. *Nutrition*, 21:467–473.
- Solano L. & Torres L.** (2013). Determinación de las inmunoglobulinas G y M en la leche materna humana (calostro).
- Velonà T, Abbiati L, Beretta B, Gaiaschi A, Flaùto U, Tagliabue P, Galli CL, Restani P.** (1999). Protein profiles in breast milk from mothers delivering term and preterm babies. *Laboratory of Toxicology, University of Milan, Italy.*
- Verhasselt V.** (2015). Is infant immunization by breastfeeding possible? *Phil. Trans. R. Soc., B* 370.

Wang N, Lo Presti L, Zhu Y-H, Kang M, Wu Z, Martin SG, Wu J-Q (2014).

The novel proteins Rng8 and Rng9 regulate the myosin-V Myo51 during fission yeast cytokinesis. *J Cell Biol*, 205:357– 375.

Wu J-Q, Kuhn JR, Kovar DR, Pollard TD (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell*, 5:723–734.

Yu D, Guo Q, Zhi G, Xin D, Xiao H, Zhen D, Ying Ma, Qing H. (2011). The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chemistry*, 127:1193–1198

ANEXOS

ANEXO N° 01

MUESTRA N° 01

Lectura del espectrofotómetro: 495.4 $\mu\text{g/mL}$: hicieron las conversiones de proteínas para 1mL de leche materna.

$$495.4 \mu\text{g/mL} \rightarrow 20\mu\text{L}$$

$$X \mu\text{g/mL} \rightarrow 1000\mu\text{L}$$

$$X = 24770 \mu\text{g/mL}$$

❖ Se multiplica por 2 (volumen de la cubeta 2mL)

$$X = 49540 \mu\text{g/mL}$$

❖ Se hace la conversión de $\mu\text{g/mL}$ a mg/mL .

$$X = 49.54 \mu\text{g/mL}$$

Se utilizó el mismo procedimiento para las siguientes muestras.

ANEXO N° 02

MUESTRA N° 01

La cantidad de muestra utilizada para la electroforesis es de **30 μ g** de proteína contenida en **10 μ L** de muestra, hicieron las conversiones utilizando la suma del área total de las bandas con la banda de inmunoglobulina G.

$$30 \mu\text{g} \rightarrow 200330.387 \text{ pixeles total de las bandas}$$

$$X \mu\text{g} \rightarrow 52298.861 \text{ pixeles total de la banda de IgG.}$$

$$X = 7.83 \mu\text{g de IgG.}$$

❖ Se utilizó **10 μ L** de muestra.

$$7.83 \mu\text{g de Ig G} \rightarrow 10\mu\text{L de muestra utilizada}$$

$$X \mu\text{g} \rightarrow 1\mu\text{L de muestra utilizada}$$

$$X = 0.783 \mu\text{g}/\mu\text{L de Ig G.}$$

❖ Se hace la conversión de $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ a mg/mL se obtiene

$$X = 0.783 \text{ mg/mL de Ig G}$$

Se utilizó el mismo procedimiento para las siguientes muestras.

ANEXO N° 03:

Electroforesis en gel de poliacrilamida discontinua (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Weber y Osborn, adaptado por Chimoy et al. (1989).

Gel de separación o resolución al 12% se utilizó lo siguiente:

❖ 30% poliacrilamida	4170 μ L
❖ Agua destilada	4400 μ L
❖ 1.5M Tris-HCl pH 8.8	1250 μ L
❖ SDS al 10%	100 μ L
❖ Sulfato de Amonio 10%	100 μ L
❖ TEMED	10 μ L

Gel de stacking corrida al 5%, se utilizó lo siguiente:

❖ 30% poliacrilamida	750 μ L
❖ Agua destilada	3500 μ L
❖ 1M Tris-HCl pH 6.8	625 μ L
❖ SDS al 10%	50 μ L
❖ Sulfato de Amonio 10%	500 μ L
❖ TEMED	5 μ L

Loading - buffer o solución indicadora de corrida, se utilizó lo siguiente. 2mL (5x)

❖ Glicerol al 25%	500 μ L
❖ SDS al 10%	0.20gr
❖ 0.5M Tris-HCl pH 6.8	1000 μ L
❖ β – Mercaptoetanol al 20%	400 μ L
❖ Azul de bromo fenol	0.01mg/mL
❖ Agua destilada csp	2mL

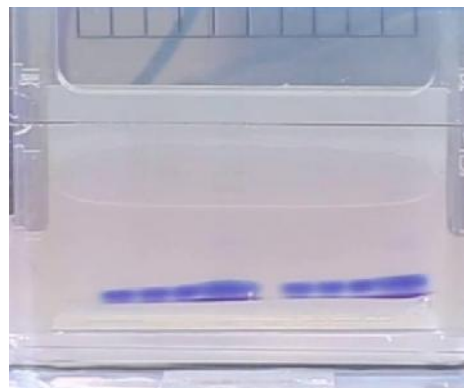
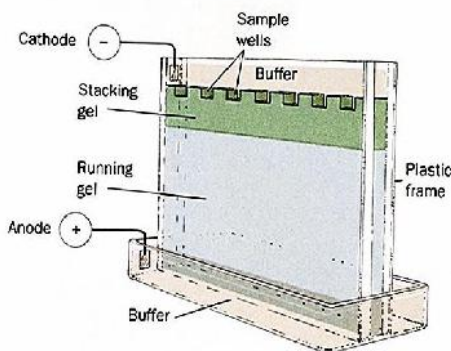
Buffer de corrida o buffer Tris-Glicina, se utilizó lo siguiente.

200mL (5x)

❖ Tris base 0,025M pH8.3	3gramos
❖ Glycine 192mM	14,4gramos
❖ SDS 10%	1gramo
❖ Agua destilada csp	200ml

Se utilizó una cámara electroforética de vidrio (12 cm de largo, 10 cm de ancho, con un peine de 1mm de espesor con 12 hendiduras (pozos) de 30 μ L c/u). En los 2/3 de la cámara inferior se preparó el gel de separación (Acril: Bisacril - 12%), después de añadir los agentes polimerizantes TEMED y persulfato de amonio se aguardó 10 minutos hasta que polimerizo, luego se añadió el gel de corrida (Acril: Bisacril - 5%) adaptándose el peine para formar las hendiduras donde se aplicaron los filtrados (L) a analizar. Así, mismo para estimar el peso molecular se utilizó un estándar de la

cadena pesada de Inmunoglobulina G ($10\mu\text{L} = 5\mu\text{g}$), también se aplicó ($20\mu\text{L}$) de un estándar de proteínas de pesos moleculares de amplio rango: ($97.4 - 14.4\text{kDa}$) y los filtrados de leche L ($30\mu\text{g}$ de proteína), la cámara electroforética fue conectada a una fuente poder a 50mA dejándose correr las muestras por 2 horas y 30 minutos aproximadamente. Terminada la corrida electroforética la cámara fue desconectada, el gel fue retirado y lavado con agua destilada y luego teñido por inmersión en una solución de commassie blue R-250 (0.25%) por 3 horas, luego desteñidos en una solución decolorante (Metanol, Ac. Acético, Agua Destilada).



ANEXO N° 04:

Western Blot de acuerdo con el protocolo de Bio Rad.

Buffer de transferencia se utilizó lo siguiente:

❖ Tris base	5.8 g.
❖ Glicina	2.9 g.
❖ SDS	0.37g.
❖ Etanol absoluto	200mL.
❖ Agua destilada	csp 1000mL.

Solución de lavado o tris - Buffer salino (TBS - TT), se utilizó lo siguiente:

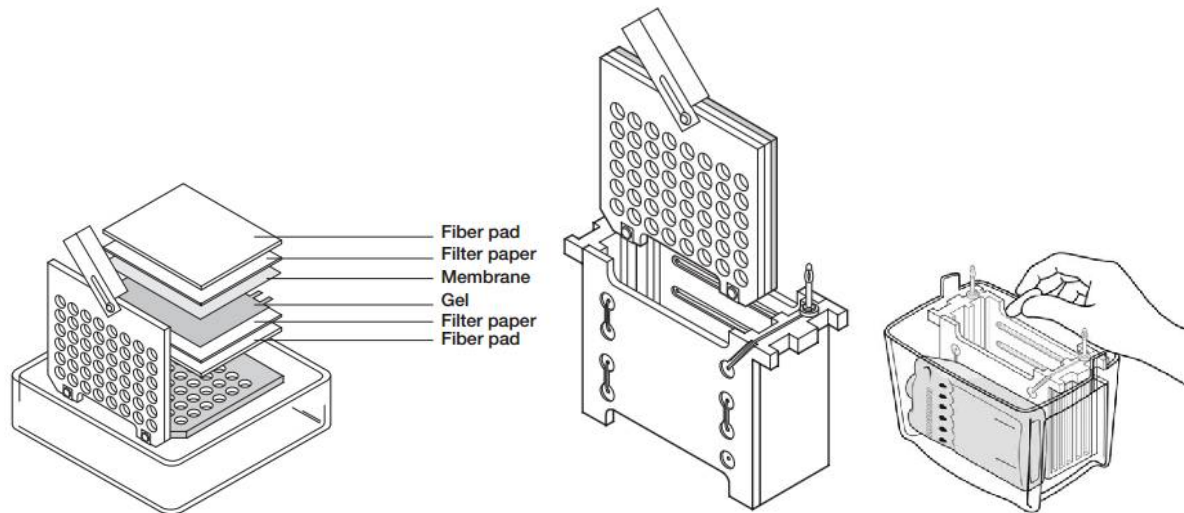
❖ Tris base	2.44 g.
❖ NaCl	8 g.
❖ Tween X – 20	10mL.
❖ Triton X – 100	10mL.
❖ Agua destilada csp	1000mL.

Solución de bloqueo con TBS, se utilizó lo siguiente:

- ❖ Tris – buffer salino (TBS - TT)
- ❖ Leche desnatada en polvo 10%

Elaboración de la electroforesis en gel de poliacrilamida discontinua (SDS – PEGE) para separar las muestras, conectada a una fuente poder por dos horas y media (anexo N° 03). Usando un marcador de masa molecular pre teñido. Terminada la corrida electroforética la cámara fue desconectada, transferir las proteínas del gel de SDS

– PAGE a la membrana de nitrocelulosa usando una cuba de transferencia y un buffer de transferencia, conectar a una fuente poder a 45mA por una hora.

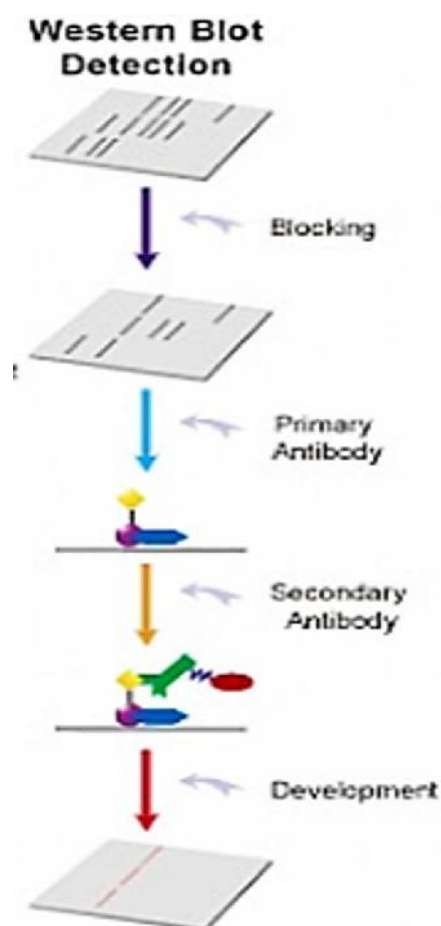
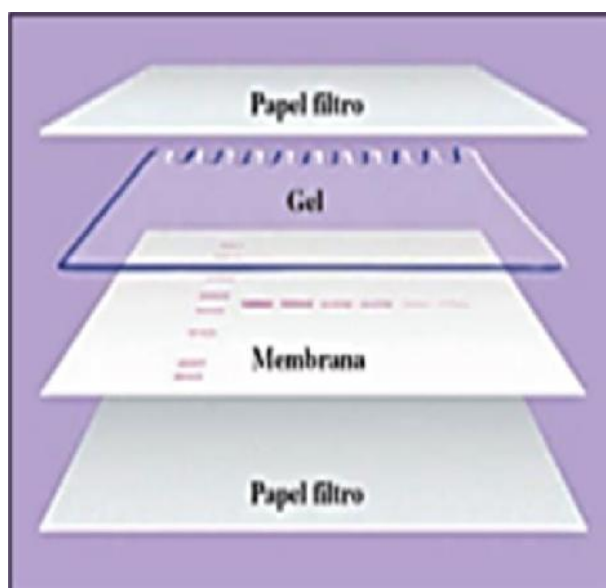


Terminada la transferencia la cámara fue desconectada, la membrana de nitrocelulosa fue retirada y teñido por inmersión en una solución colorante de rojo de Ponceau por dos minutos para colorear las proteínas y así verificar la transferencia, luego haga lavados sucesivos con agua destilada para eliminar el colorante.

Bloquear los sitios libres de la membrana de nitrocelulosa utilizando un solución de bloqueo por dos horas a temperatura ambiente en agitación. Terminado el bloqueo se hicieron tres lavados sucesivos con intervalos de 10 minutos. Incubar la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo primario (anti – Ig G) con agitación de 50 rpm por dos horas a temperatura ambiente. Terminada la incubación se lavó con solución de lavado conteniendo leche desnatada en polvo al 5%, se hicieron tres lavados sucesivos con incubación de 10 minutos cada uno. Incubar con

el anticuerpo secundario (anti – anti – Ig G) por una hora. Terminado la incubación se lavó tres con solución de lavado conteniendo leche desnatada en polvo al 5%, se hicieron tres lavados sucesivos con incubación de 10 minutos cada uno. Para la detección se agrego peróxido de hidrogeno hasta cubrir la membrana de nitrocelulosa, se incubo en agitación hasta que apareciera las bandas, protegiéndolo de la luz.

Finalmente las membranas fueron escaneadas y registradas



ANEXO N° 05:

Cuantificación de inmunoglobulina G utilizando el programa Imagej v. 1.46., se siguieron los siguientes pasos:

Imagej es un programa de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health, utilizada para el procesamiento y análisis de imágenes procedentes de microscopía, radiología y en general cualquier imagen.

1. Descargar el programa Imagej v. 1.46.
2. Instalar el programa Imagej v. 1.46. ejecutable en Windows XP, Windows 7, Windows 8.
3. Desde el programa ImageJ, abra la imagen de la figura.
4. En la opciones del menú “Analyze/Gels/select First Lane”.
5. Se elige las medidas (ancho de la banda) que desee obtener el área de la partícula y las coordenadas del centro de la partícula. Haga clic en “OK”.
6. Aparecerá una ventana nueva titulada “Results”. En ella, se muestran varias columnas con los resultados:
7. El Área de la partícula muestra el número de píxeles que ocupa la partícula.

