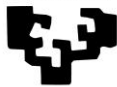


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

PEPTIDASEN JARDUERA
GILTZURRUNEKO ZELULA ARGIEN
KARTZINOMAN: ANALISIA ETA BI
ESPEKTROFLUORIMETROREN
EMAITZEN KONPARAKETA

Ikaslea: *Olaizola Larrañaga, Jone*

Data: 2016ko ekaina

Ko-zuzendariak

Begoña Sanz Echevarria Doktorea

Usue Ariz Lopez de Castro Doktorea

Ikasturtea

2015/16

LANEAN ZEHAR ERABILIKO DIREN LABURDURAK

ACE2:	Angiotentsina eraldatzen duen entzima II
APB:	Aminopeptidasa basikoa
APN:	Aminopeptidasa neutroa
ASP:	Aspartil aminopeptidasa
CAP:	Zistinil aminopeptidasa
CCRCC:	Giltzurruneko zelula argien kartzinoma
DPPIV:	Dipeptidil peptidasa IV
ES:	Bataz bestekoaren errore tipikoa
GAP:	Glutamil aminopeptidasa
MOE:	Munduko Osasun Erakundea
NEP:	Endopeptidasa neutroa
PSA:	Puromizinarekiko sentikorra den aminopeptidasa
PU:	Peptidasa unitatea
RCC:	Giltzurruneko zelulen kartzinoma

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
1.1.Giltzurruneko minbizia	1
1.2.Peptidasak eta minbizia	2
1.3.Peptidasak eta giltzurruneko minbizia	4
1.4.Espektrofluorimetroak	4
2. HELBURUAK	6
3. MATERIALAK ETA METODOAK	6
3.1.Laginak	6
3.2.Peptidasen jarduera entzimatiakoaren azterketa	6
3.2.1. Laginen prestaketa	7
3.2.2. Laginetako proteinaaren kuantifikazioa	7
3.2.3. Entsegu entzimatiakoen oinarria	7
3.2.4. Datuen analisisa	9
3.2.5. Analisi estatistikoa	10
3.3.Datuen balioztatzea: espektrofluorimetroen konparaketa	10
4. EMAITZAK	10
4.1.Lagineko proteinaaren kuantifikazioa	10
4.2.Jarduera peptidasikoa	11
4.3.Datuen balioztatzea: espektrofluorimetroen konparaketa	14
5. EZTABAIDA	15
5.1.Jarduera peptidasikoa neurtzearen garrantzia	15
5.2.Jarduera peptidasikoen aldaketak CCRCCan	16
5.3.Datuen balioztatzea: espektrofluorimetroen konparaketa	19
6. ONDORIOAK	21
7. BIBLIOGRAFIA	22
8. WEBGRAFIA	25
1 ERANSKINA	i
2 ERANSKINA	iii
3 ERANSKINA	iv

1. SARRERA

1.1.GILTZURRUNEKO MINBIZIA

Neoplasia bat, normala ez den ehun masa bat da, ehun normalen aldean, neurri ezkontrolatuan hazten dena. Neoplasiei tumore ere baderitze eta bi taldetan sailkatzen dira, onberak eta gaiztoak (Kumar *et al.*, 2008). Minbizi bezala izendatzen diren gaixotasunek ondorengo ezaugarri orokorrak dituzte: hilezkortasuna, onkogeneek eragindako hazkuntza faktoreen gehiegizko produkzioa, gene tumore supresoreek kodifikatutako anti-hazkuntza seinaleak ekiditea, heriotza zelularrarekiko erresistentzia, angiogenesisia eta metastasia (Hejmadi, 2010).

Gaur egungo gizartean minbiziak duen garrantzia aski ezaguna da, izan ere, heriotza-kausa nagusienetako da munduan. Munduko Osasun Erakundearen (MOE) arabera 2012. urtean 14 milioi kasu berri eta 8,2 milioi heriotza eragin zituen (Cáncer, 2015). Hori dela eta, gaur egun minbizia da gehien ikertzen den gaixotasuna.

Orain arte 100 minbizi mota baino gehiago ezagutzen dira. Lan honetan giltzurruneko zelulen kartzinoma (RCC) aztertuko da, giltzurruneko epitelio tubularretik sortzen dena (Cairns, 2011). Deskribatuta dauden kartzinoma guztien artean, RCCa % 2a da (Miyajima *et al.*, 2015) eta giltzurruneko 10 minbizietako 9 mota honetakoak dira, hau da, % 80-90a (Kidney Cancer (Adult)–Renal Cell Carcinoma, 2016; Bedke *et al.*, 2016).

2004ko MOEren sailkapen histologikoaren arabera hiru RCC azpi-mota nagusi daude: zelula argiena, onkozitoma eta zelula kromofoboena edo papilarra (Lopez-Beltran *et al.*, 2006). Lan honetan, konkretuki, giltzurruneko kartzinoma ohikoena aztertuko da, giltzurruneko zelula argien kartzinoma (CCRCC) alegia, RCC guztien % 75-80a dena (Bedke *et al.*, 2016). Bilakaera gaiztoa duen minbizi mota da, 3. kromosomako irregulartasunen ondorioz sortua. Jatorria tubulu proximalean du baina gaixotasun honen agerpenean parte hartzen duten bidezidorrak ugari dira eta oraindik ez dira oso ondo ezagutzen (Varona *et al.*, 2007; Cairns, 2011).

Gaur egunera arte ez dago markatzaile klinikorik RCCa momentu asintomatiko eta sendatzeko fasean detektatzeko, ezta ziurtasunez bere kurtsoa aurreikusterik ere. Hori beharrezkoa litzateke, izan ere, pazienteen % 50a sendatu egiten da gaixotasunaren

estadio goiztiarretan, baina, aurreragokoetan biziraupen aukerak izugarri gutxitzen dira (Sachdeva *et al.*, 2009). Gaur egun, medikuntzan parametro klasikoak bakarrik erabili daitezke, hau da, tipo histologikoak, estadioak eta graduak. Baina, egoera klinikoaren eta pazientearen egoeraren arabera, horiek, agian, ez dira baliagarriak izango, besteak beste gaixotasunaren aldakortasuna dela eta. Beraz, lagungarria izango litzateke parametro aurreikusgarriago batzuk bilatzea (Varona *et al.*, 2010; Majer *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016). Minbizi mota ezberdinen ezagumenduan egindako aurrerapenak erakutsi dute peptidasa batzuk tumorearen genesiarekin, hazkuntzarekin eta barreiadurarekin erlazionatuta daudela. Hala ere, horien eragina ez da oso ezaguna eta oraindik aztertzen ari da (Larrinaga *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2015; Larrinaga *et al.*, 2015).

1.2. PEPTIDASAK ETA MINBIZIA

Peptidasena oso proteina talde heterogeneoa da, mintzari loturiko proteinek zein proteina solugarriek osatzen dute eta 25-300 kDa arteko tamaina dute (Taylor, 1993). Entzima hauek peptidoen lotura peptidikoak hidrolizatzen dituzte.

Edozein organismotan, koordinatuta funtzionatu dezan, zelulen arteko komunikazioa ezinbestekoa da. Horretarako erabilitako molekula mezularien artean peptido bioaktiboak oso garrantzitsuak dira. Peptidasen ekintza biologikorik ezagunena peptido bioaktibo horien eraldaketa metabolikoa da. Euren aktibitate hidrolitikoari esker peptidasek mezulari horien ekintzak moldatu ditzakete, bai forma aktiboak ekoiztuz zein hauek inaktibatuz (Antczak *et al.*, 2001; Speth eta Karamyan, 2008). Peptido horietako askok zelula hazkunderan, apoptosiaren inhibizioan eta angiogenesisian eragin zuzena dutela deskribatu da (Heasley, 2001; Re eta Cook., 2006) eta beraz, horien erregulazioa burutzean peptidasek minbiziaren garapenean parte har dezakete. Zeregin horretan arduradun nagusiak mintz zelularrean kokatzen diren peptidasak direla adierazi izan da, mezularien funtzioa erregulatzen baitute (Taylor, 1993).

Hala ere, nahiz eta entzima hauek mintzei lotuta dituzten funtzioak askoz ezagunagoak izan, badira forma solugarri bezala aurkitu izan direnak ere (O’Cuinn, 1998; Valdivia *et al.*, 2004; Larrinaga *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2015). Forma solugarrien ekintzen ikerketan, alde batetik, zelula barneko forma solugarriak gune

extrazelularra jariatu daitezkeela deskribatu da eta bertan peptidoen andeakuntzan parte har dezaketela (Shrimpton *et al.*, 2002). Bestetik, duela gutxi arte peptidasa hauen funtzioa zelula barnean proteinen katabolismoaren azkeneko etapara mugatzen dela uste izan den arren (O’Cuinn, 1998), azkeneko hamarkadan, funtzio endokrino, parakrino eta autokrinoaz gain, mezulari peptidikoek zelula barnean ekintza izan dezaketela deskribatu da, ekoiztutako zelulan zuzenean eraginez edota kanpotik barneratuta, zelula barneko hartzaileei lotu eta funtzio intrakrino ezberdinak betez (Re *et al.*, 2006; Re, 2011). Beraz, peptidasek proteinen birziklatzeaz gain mezulari intrakrinoen erregulazioan ere parte har dezaketela proposatu da (Ferro *et al.*, 2004).

Peptidoen erregulazioa burutzeaz gain, euren aktibitate katalitikoari esker zelulaz kanpoko matrizearen degradazioan ere parte hartzen dute peptidasek. Horrela, minbizia sortu den organoan zehar hazi, inguruko ehunak infiltratu eta distantzian hedatzeko zelulaz kanpoko matrizearen endekapenean parte hartzen dute (Carl-McGrath *et al.*, 2006).

Azkenik, orain aipatutako mekanismoez gain, edo beraiekin batera, peptidasen aktibitate katalitikoaz gaindiko ekintzak kontuan hartu behar dira (Huang *et al.*, 2011). Alde batetik, peptidasa batzuek hartzaile funtzioa izan dezakete zelula barneko seinale-transdukzioa eraginez, zelula hazkundera eta migrazioa bezalako funtzioak baldintzatuz (Antczak *et al.*, 2001; Sumitomo *et al.*, 2005). Bestetik, atxikidura molekula bezala joka dezakete, gorputzean zeharreko zelulak ezagutuz edo zelulek ezagutuak izanez, horrela, metastasia gerta daitekeelarik (Riemann *et al.*, 1999; Carl-McGrath *et al.*, 2006).

Azaldutako ezaugarri guzti horiek kontuan hartuz, posible da peptidasen eragina neoplasia mota ezberdinetan euren jarduera biologiko guztien emaitza netoa izatea, bai mintzeko frakzioko peptidasena eta baita frakzio solugarrikoena ere. Horrela, argi geratzen da neoplasiaren aldakortasun eta konplexutasuna.

1.3. PEPTIDASAK ETA GILTZURRUNEKO MINBIZIA

Arestian esan bezala, argi ikusten da peptidasek beren funtzio biologiko ugariak direla eta, minbiziaren garapenean parte har dezaketela. Hori dela eta, interes handiko molekulak dira gure ikergai den gaixotasunaren ulermenean, baita diagnosirako, pronostikorako eta tratamendurako erremintak diseinatzeko ere. Horretarako, oso lagungarria izango litzateke hurbilketa fisiologiko bat egitea CCRCCko peptidasa ohikoenen profil bat eratzera, bai mintzeko frakzioan eta baita frakzio solugarrian ere.

Lan honetan CCRCC minbizi motan markatzaile gisa deskribatuak izan diren peptidasak aztertuko dira: NEP/CD10 (Endopeptidasa neutroa), DPPIV/CD26 (Dipeptidil peptidasa IV), GAP/gp160 (Glutamil aminopeptidasa) eta APN/CD13 (Aminopeptidasa neutroa). Baita minbiziaren prozesu patologikoetan garrantzitsuak izan daitezkeen peptidasa gehiago ere: PSA (Puromizinarekiko sentikorra den aminopeptidasa), APB (Aminopeptidasa basikoa), CAP (Zistinil aminopeptidasa), ACE2 (Angiotentsina eraldatzen duen entzima II) eta ASP (Aspartil aminopeptidasa).

1.4. ESPEKTROFLUORIMETROAK

Azken urteotan, UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Sailean giltzurruneko minbiziaren (kasu batzuetan, konkretuki CCRCCaren) eta peptidasen arteko erlazioa ikertzen ari da. Alegia, minbizi mota hori ulertzeko helburuarekin, lortu izan da teknika espektrofluorimetrikoen bidez peptidasen jarduera neurtzea. Orain arte lan hau burutu den laborategi horretan RF-540 (Shimidazu) espektrofluorimetroa erabili izan da jarduera peptidasikoen ondorioz sortutako fluoreszentiaren neurketak egiteko (Larrinaga *et al.*, 2007; Varona *et al.*, 2007; Larrinaga *et al.*, 2010; Varona *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2015).

RF-540 (Shimidazu) espektrofluorimetroa (hemendik aurrera “lehenengo ekipoa” bezala ere azalduko da) oso erabilia da medikuntzan, ikerketan, industrian, nekazaritzan eta arkeologian. 200 eta 700 nm bitarteko uhin luzerak erabiltzea baimentzen du bai kitzikapenerako eta baita emisiorako ere. Baina, ez da kapaza

putzu ugaridun plakak irakurtzeko, eta beraz, neurketak banan-banan burutu behar dira (Shimidazu RF-540 espectrofotómetro de fluorescencia, d. g.).

Aurrerapen teknologikoak direla eta, gaur egun posible da peptidasen jarduerak modu eraginkorragoan neurtzea (BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader, d. g.). Hori dela eta, ikerketa lan honetan laborategirako eskuratutako espektrofluorimetro berri bat erabili da, FLUOstar Optimaz (BMG Labtech), alegia.

FLUOstar Optima (BMG Labtech) espektrofluorimetroa (hemendik aurrera “bigarren ekipoa” bezala ere azalduko da) oso erabilia da gaur egun osasun zentroetako laborategietan eta baita laborategi industrialetan ere. 230 eta 900 nm bitarteko uhin luzerak erabiltzea baimentzen du bai kitzikapenerako eta baita emisiorako ere. Guztiz automatizatutako aparatua da, putzu ugaridun (6-1536 putzu bitarteko) mikroplakak irakurtzeko gai dena ordenagailuan botoi gutxi batzuk sakatzearekin bakarrik. Hori gutxi balitz, aparatu hau, fluoreszentsiaz gain, beste parametro batzuk ere neurtzeko gai da, besteak beste, absorbantzia eta luminiszentzia. Horrela, gauza ugari determinatzeko kapaza da: aktibitate entzimatikoa, kaltzioa, zelulen toxikotasuna, proliferazioa eta bideragarritasuna, proteina eta azido nukleiko kopurua, ATP kopurua, etb. eta beraz, laborategietan aparatu gutxiago eduki beharra baimentzen du (BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader, d. g.).

Bi ekipoen deskribapen horiei erreparatuz, argi dago gaur egun erabiltzen denak hainbat abantaila dituela orain arte laborategian erabilitakoarekiko. Hori horrela izanik, erraz ikus daiteke laborategietan teknika eta teknologien berritzearen garrantzia. Oraingo lan honetan aurretik egindako esperimentuetan baino erraztasun gehiago eduki dira, ikerlarien denbora eta lana aurreztuz, eta, gainera, emaitza zehatzago eta fidagarriagoak lortzea espero da.

Hala ere, ezinbestekoa da bigarren ekipoa laborategiko esperimentu guztietan erabiltzen hasi aurretik datuak balioztatzen direla ziurtatzea, hau da, antzeko emaitzak lortzen direla edozein aparatu erabilia. Horretarako, lan honetan lehenago RF-540 espektrofluorimetroarekin CCRCC minbizian neurtutako jarduera peptidasikoak aztertuko dira FLUOstar Optima espektrofluorimetroarekin. Horrela, ea emaitza berdinak lortzen diren eta beraz, ea bi teknikek berdin funtzionatzen duten kontrolatuko da. Hala ere, ez dira aurreko esperimentuetako lagin berdinak aztertuko

lan honetan, eta inguruneko faktoreen eragina ere ez da berdina izango, eta beraz, aldagai horiek oso kontuan hartu beharreko parametroak izango dira emaitzak analizatzerako orduan (Sousa eta Malcata, 1996; Factors affecting enzyme activity, d. g.).

2. HELBURUAK

- 1) FLUOstar Optima espektrofluorimetroaz baliatuz garrantzi biologikoa eta fisiologikoa duten peptidasen jarduera entzimatiakoak neurtzea CCRCC motako minbizidun pazienteen laginetan.
- 2) Bi espektrofluorimetroren (FLUOstar Optima eta RF-540) funtzionamenduen konparaketa burutzea.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1.LAGINAK

Ikerlan honek Osakidetzaren Ikerkuntza Klinikoaren eta Unibertsitateko Batzorde Etikoaren adostasuna jaso zuen (CEIC 11-51). Lan honetan aztertutako lagin guztiak giltzurruneko neoplasiadun pazienteetatik eskuratu ziren, Euskal Biobankotik. Denera, CCRCCdun 13 pazienteren laginak aztertu ziren (n=13), bakoitzaren lau gune: hiru neoplasia eta minbiziaren aldamenean zegoen baina patologikoa ez zen giltzurrun ehun zatia. Paziente bakoitzaren tumoreen graduak eta estadioak adituek ezarriak izan ziren laborategian jaso aurretik. 13 pazienteak gizonak ziren, 61 urteko batz besteko adinarekin (zaharrenak 78 urte zituen eta gazteenak 52). Horrela lortutako laginak, jarduera entzimatiakoak aztertu aurretik ultra-izozgailuan gorde ziren -80 °C-tan.

3.2.PEPTIDASEN JARDUERA ENTZIMATIKOAREN AZTERKETA

Ikerketa lan honetan erabili ziren aparatuek, soluzioak, erreaktiboak eta produktuak **1 Eranskinean** adierazten dira.

3.2.1. Laginen prestaketa

Lortutako lagin guztietan, bai gune neoplasikoetan eta baita minbiziaren aldameneko ehun ez patologikoetan ere, 9 entzimaren jarduera peptidasikoa aztertu zen mintzeko frakzioetan eta frakzio solugarrietan. Prozesu osoan zehar laginak 4 °C-tan mantendu ziren.

Laginak homogeneizatu egin ziren behin desizoztu ostean (-80 °C-tik 4 °C-ra pasaz). Horretarako, lagin bakoitzaren 100 mg 1 ml Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) tanpoi indargetzailetan bersuspenditu eta Micra D1 (ART) ultraturaxean homogeneizatu ziren. Lorturiko nahasketa ultrazentrifugatu egin zen 35000 g-tara, 35 minutuz eta 4 °C-tan Centrikon T2190 ultrazentrifuga erabiliz. Horrela lortutako gainjalkina *ependorff* saiholdietan gorde zen, hau baitzen Frakzio Solugarria. Gelditzen zen jalkina lehen aipatutako indargetzaile berbera erabiliz hiru aldiz garbitu zen gelditu zitezkeen ezpurutasunak kentzeko. Jalkin horri 1 ml Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) tanpoia gehitu zitzaion eta Micra D1 (ART) ultraturaxaren bidez homegeneizatu egin zen. Ondoren, Labofuge 200 (Heraeus) zentrifuga erabiliz, zentrifugazio labur bat egin zen, 1600 g-tara. Kasu honetan ere, gainjalkina jaso zen *ependorff* saiholdietan, hori baitzen Mintzeko Frakzioa.

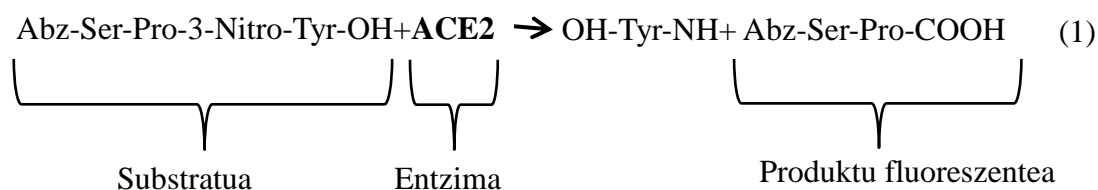
3.2.2. Lagineko proteinaren kuantifikazioa

Lagin mota ezberdinetan zegoen guztizko proteina kopurua zein zen neurtzeko, Bradforden teknika erabili zen (Bradford, 1976). Horretarako, 200 µl Bradford errektibo eta 790 µl ur distilatu gehitu zitzaizkion prozesatutako 10 µl lagini. Ondo irabiatu eta 10 minutuz erreakziona zezan itxaron ostean, absorbantzia neurtu zen 595 nm-tara FLUOstar Optima (BMG Labtech) espektrofotometroan. BSA kontzentrazio ezagunak eta beren absorbantzia erlazionatzen zituen zuzen patroia eraikiz eta erabiliz, lagin bakoitzaren proteina kontzentrazioa determinatu zen.

3.2.3. Entsegu entzimatioko oinarria

Eskuratutako laginetako peptidasa ezberdinen jarduera aztertu zen (frakzio solugarrikoa eta mintzeko frakziokoa), bai lagin patologikoetan baita tumorearen alboko lagin ez patologikoetan ere. Burututako entsegu guztiak teknika

espektrofluorimetrikoetan oinarrituak izan ziren (FLUOstar Optima (BMG Labtech) espektrofluorimetroa erabili zen). Entseguak burutzeko, laginak aztertu nahi zen peptidasa bakoitzaren substratu espezifikoekin inkubatu ziren (**1 Taula**). Entsegu bakoitzaren pH eta errektibo zehatzak lehenagotik ezarriak zeuden eta **2 Eranskinean** ageri dira (Florentin *et al.*, 1984; Alba *et al.*, 1989; Mantle *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 2001; Larrinaga *et al.*, 2007; Varona *et al.*, 2007; Larrinaga *et al.*, 2010; Varona *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2014). Esperimentu hauetarako, substratu horietako bakoitza fluoroforo bati konjugatuta zegoen. Horrela, entzima bakoitzak bere jardura espezifikoaren bidez bere substratua hidrolizatzean fluoroforoa askatzen zen produktu gisa, eta horrek fluoreszentzia emititzen zuen. Emititutako fluoreszentzia espektrofluorimetroaren bidez neurgarria zen, uhin luzera konkretu bat zuen argi izpi batez kitzikatzean, beste uhin luzera bat zuen argi izpia jaurtiko zuelako.



(1) Ekuazioan adierazten da entsegu entzimatiakoetako baten emandako erreakzioaren adibide bat, ACE2 peptidasak burututakoarena, hain zuzen ere. Erreakzio horretan produktu fluoreszentea, eta beraz, neurgarria, Abz-Ser-Pro-COOH izan zen.

Laginetako entzima ezberdinen jarduerak neurtu baino lehen, peptidasa bakoitzaren baldintza espezifikoak optimizatuak izan ziren. Hau da, produktuen kurbak, substratu kontzentrazio saturanteen determinazioa eta inhibizio saioak bezalako esperimenduak burutu ziren laborategian, entsegu bakoitzerako baldintza egokiak ezartzeko helburuarekin. **1 Taulan** azaltzen dira peptidasa bakoitzaren substratu espezifiko bakoitzaren kasuan askatzen den fluoroforoa eta bere fluoreszentzia jaso eta neurtu ahal izateko ezarri beharreko baldintzak.

Peptidasa bakoitzaren kasuan, hiruna ale aztertu ziren (hiruna errepika) eta zuriak egiteko laginaren ordeztanpoi indargetzailea erabili zen, horrela, laginari ez zegokion argia ezeztatzea lortuz.

1 Taula: Entzima bakoitzaren substratuak eta baldintzak. Peptidasa bakoitzaren substratu espezifikoak eta entseguetan erabilitako kontzentrazioak eta bolumenak, entsegu bakoitzean erabilitako lagin kopuruak, jarduera entzimatikoen ondorioz askatutako fluoroforoak, entsegu bakoitzerako erreakzio denborak eta fluoreszentzia neurtzeko kitzikapen eta emisio uhin luzerak. Entsegu guztiak 37 °C-tan egin ziren. $K \lambda / E \lambda$ = Kitzikapen uhin luzera / Emisio uhin luzera. **NA** = naftilamida. **SPNPT** = Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH. **SP** = Abz-Ser-Pro-COOH. **DAGNPG** = N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly. **DAG** = N-Dansyl-D-Ala-Gly-COOH.

Substratua		Lagin kopurua (μl)	Askatutako fluoroforoa	Entzima	Inkubazio denbora	$K \lambda / E \lambda$ (nm)	
Izena	mM						Bol. (μl)
Ala-β-NA	2	95	5	β-Naftilamina	30 min	345/412	
Ala-β-NA	2	95	5				
Arg-β-NA	2	90	10				
Glu-β-NA	0,227	190	10				
Cys-di-β-NA	0,135	190	10				
H-Gly-Pro-β-NA	2	190	10				
Asp-β-NA	0,168	190	10				
SPNPT	0,5	70	30	SP	ACE2	2 ordu	355/410
DAGNPG	1	70	30	DAG	NEP	30 min	342/562

3.2.4. Datuen analisia

Jarduera peptidasikoa adierazteko erabiltzen diren unitateak peptidasa unitate (PU)/mg proteina dira. Peptidasa unitate bat minutuko pmol bat substratu hidrolizatzen duen entzima kopuru bezala azalduko da. Beraz, unitate horiek lortu ahal izateko kalkulu batzuk egin beharra dago espektrofluorimetroak fluoreszentzia erlatibo bezala ematen baititu emaitzak. Horretarako, fluoroforo kontzentrazio (nM-etan) jakinen eta horiek emititzen duten fluoreszentiaren arteko erlazioa (produktuen kurbak), lagin kopurua, lagin bakoitzeko proteina kontzentrazioa eta entsegu bakoitzaren erreakzio denbora kontuan hartu behar izan ziren.

3.2.5. Analisi estatistikoa

Esperimentuetan lortutako datu numerikoak *Microsoft Excel* kalkulu orrietan prozesatu ziren, paziente bakoitzaren 3 gune patologikoen emaitzen batez besteko bat egin zelarik. Analisi esperimentaletan lortutako emaitzak $n=13$ laginen batez besteko \pm ES (bataz bestekoaren errore tipikoa) bezala adierazi ziren. Behin datuak prozesatuta, bariantzen homogeneitatea aztertu zen. Gero, Shapiro-Wilk-en normalitate testa burutu zen $n<50$ zelako. Ondoren, bariantzen homegeneitadedun eta banaketa normaldun peptidasen tumore ehunaren eta ehun normalaren arteko jardueraren ezberdintasunaren adierazgarritasun estatistikoa aztertzeko Student-en t-testa burutu zen. Aldiz, aurreko bi baldintzetako bat betetzen ez zuten peptidasen kasuan Mann-Whitney U-test ez-parametrikoa burutu zen. Dena SPSS 20 programa estatistikoa erabiliz egin zen. Adierazgarritasun estatistikoa adierazteko (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$ eta (***) $p<0,001$ erabili ziren, emaitzak adierazgarriak, oso adierazgarriak edo guztiz adierazgarriak zirenaren arabera, hurrenez hurren.

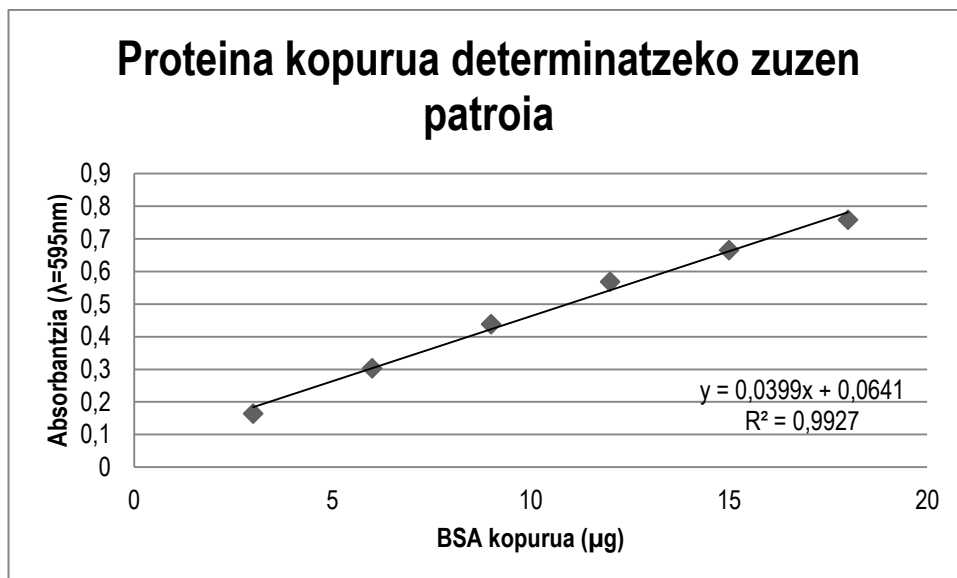
3.3.DATUEN BALIOZTATZEA: ESPEKTROFLUORIMETROEN KONPARAKETA

Sarreran azaldu bezala, bi espektrofluorimetroren konparaketa bat burutu zen (FLUOstar Optima (lan honetan erabilitakoa) eta RF-540 (lehenago laborategi bereko lanetan erabilitakoa)). Horretarako, ikerlan honetan lortutako emaitzak lehenago laborategi bereko ikerlariak argitaratutako emaitzekin konparatu ziren.

4. EMAITZAK

4.1.LAGINEKO PROTEINAREN KUANTIFIKAZIOA

Lagineko proteina kopurua kuantifikatzeko Bradford (Bradford, 1976) metodoa erabiliz BSAn kopuru ezagunen absorbantziak neurtuz lorturiko zuzen patroia ageri da **1 Irudian**. Zuzena eraikitakoan, lagin bakoitzaren 10 μ l-ren absorbantzia neurtu zen metodo berdina erabiliz ($\lambda=595$ nm). Kontzentrazioa, 10 mg/ml ingurukoa izan zen kasu gehienetan, gainontzeko laginak kontzentrazio horretara doitu ziren Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) tanpoia erabiliz.

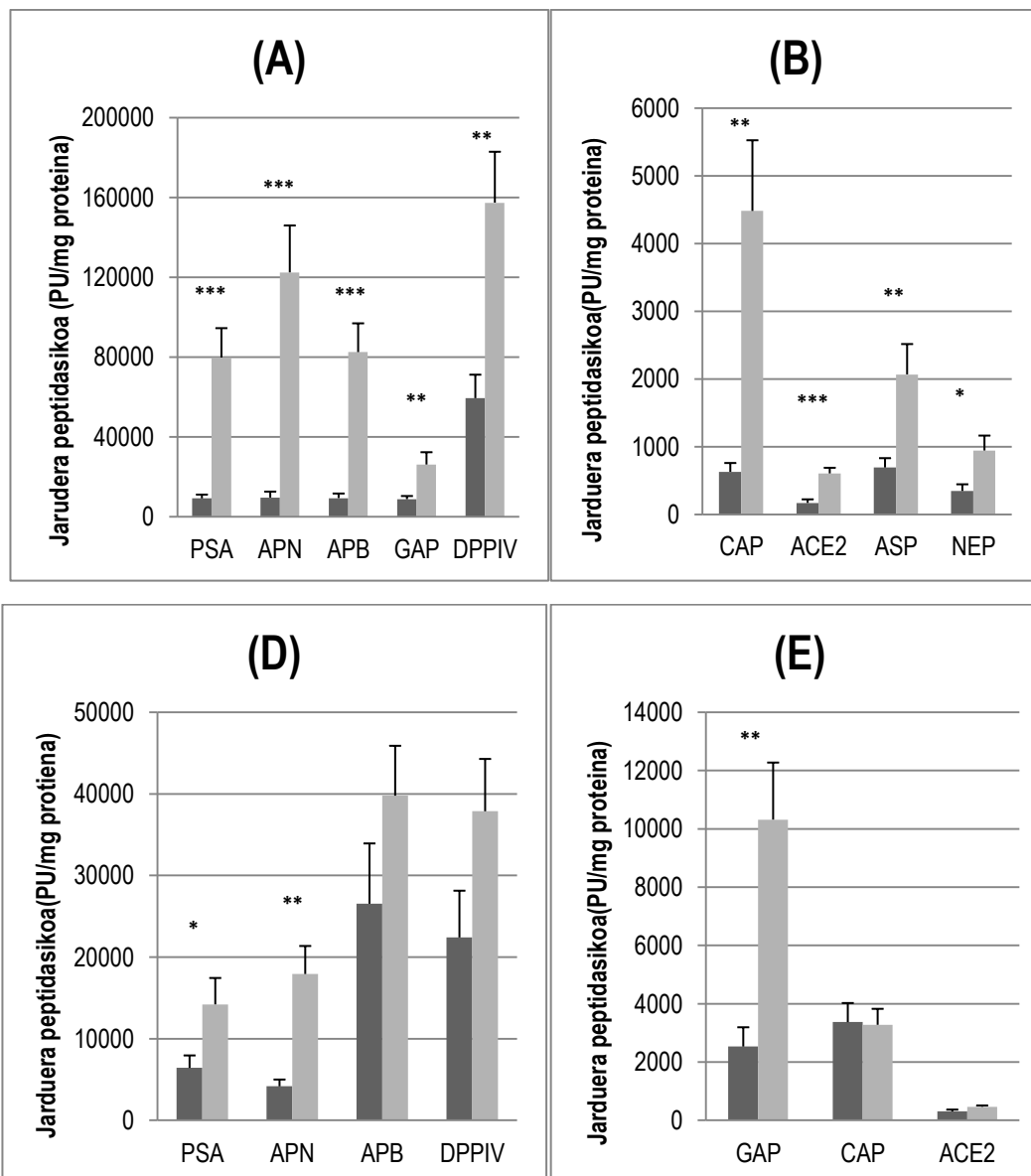


1 Irudia: BSaren kopuru ezagunen absorbantziekin eraikitako zuzen patroia. BSaren kopuru jakinen eta beren absorbantziaren ($\lambda=595$ nm) arteko erlazioa Bradford (Bradford, 1976) metodoa erabiliz lortua. BSA kopuru bakoitzerako egindako hiru errepiken batuz besteko absorbantzia erabili zen zuzena eraikitzeko.

4.2.JARDUERA PEPTIDASIKOA

Behin entsegu entzimatikoen bidez aktibitate peptidasikoak PU/mg proteina unitatetan lortutakoan, balio negatibo eta oso baxuak baztertu egin ziren. Terminologia sinplifikatzearen, hemendik aurrera “ehun normala” terminoa erabiliko da neoplasiarik ez zuen tumorearen alboko ehunari erreferentzia egiteko eta “ehun tumoral” edo CCRCC dagokigun giltzurruneko ehun neoplasikoari erreferentzia egiteko.

Jarraian aipatuko diren emaitzak **2 Irudiko** grafikoen interpretazioa izango dira, horietan peptidasa bakoitzak ehun tumoralean eta ehun normalean izan zituen jarduera entzimatikoak konparatuko dira, bai mintzeko frakzioan eta baita frakzio solugarrian ere. Zenbakizko datu guztiak taula batean azalduko dira **3 Eranskinean**.



2 Irudia: Aztertutako peptidasa bakoitzaren jardueraren balioak CCRCC ehun tumoralean (zutabe gris ilunak ■) eta ehun normalean (zutabe gris argiak ■). (A,B): Mintzeko frakzioa; (D, E): Frakzio solugarria. Entzimen jarduera PU (hidrolizatutako pmol substratu fluorogeniko/min) mg proteinako adierazten da. Batez besteko balioa ± ES adierazia. (n = 13). Adierazgarritasun estatistikoa: (*) p<0,05, (**) p<0,01 eta (***) p<0,001 adierazia.

Lan honetan PSA, APN, APB, GAP, CAP, DPPIV eta ACE2 peptidasen jarduera entzimatiakoak aztertu ziren bai mintzeko frakzioan eta baita frakzio solugarrian ere, ASP eta NEP peptidasen kasuan, mintzeko frakzioan bakarrik. Jarduera horiek, **2 Irudian** erakusten den bezala, baxuagoak izan ziren CCRCC ehun tumoralean

inguruko ehun normalean baino ia kasu guztietan. Salbuespen bakarra CAP entzimaren frakzio solugarriko jarduera izan zen, izan ere, kasu horretan jarduera altuagoa neurtu zen ehun tumoralean ehun normalean baino.

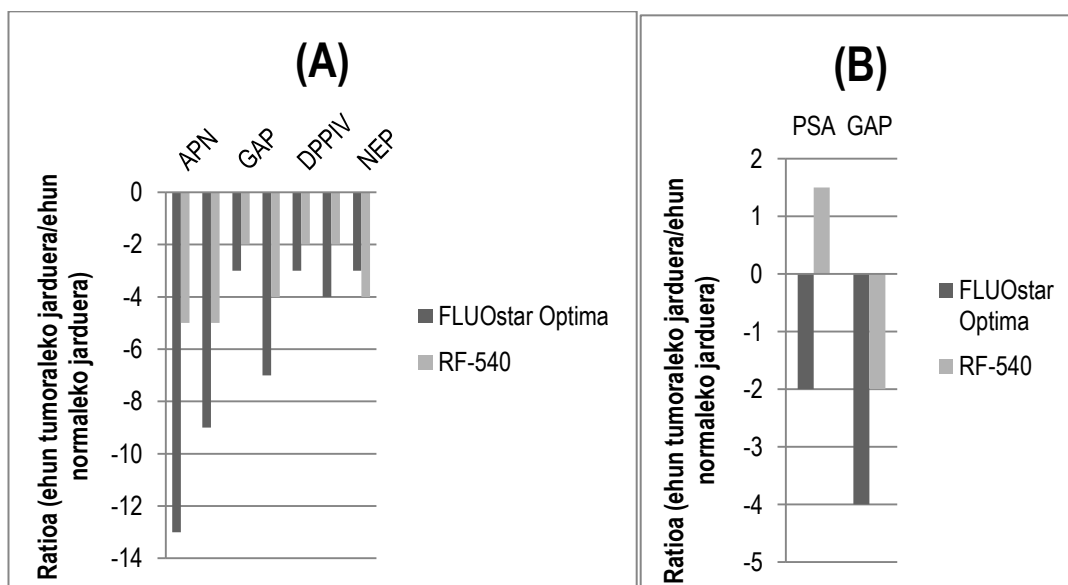
Alde batetik, beraz, ehun tumoralean jarduera entzimatiakoaren jaitsiera jasan zuten peptidasak daude. **2 Taulan** ehun tumoraletan ehun normalekiko zenbat aldiz aktibitate baxuagoa neurtu zen adieraziko da, baita ezberdintasun hori estatistikoki adierazgarria izan zen edo ez ere.

2 Taula: Ehun tumoralean jarduera peptidasikoaren jaitsiera jasan zuten entzimen emaitzak mintzeko frakzioan eta frakzio solugarrian. Entzima bakoitzak zenbateko jaitsiera izan zuen ehun tumoralean ehun normalarekiko eta ezberdintasun hori estatistikoki adierazgarria izan zen edo ez, hala izatekotan, adierazgarritasun estatistikoa $p < 0,05$, $p < 0,01$ edo $p < 0,001$ bezala adierazia. **p** = adierazgarritasun estatistikoa.

Mintzeko frakzioa			Frakzio solugarria		
Entzima	Zenbateko jaitsiera	p	Entzima	Zenbateko jaitsiera	p
PSA	9 aldiz	$p < 0,001$	PSA	2 aldiz	$p < 0,05$
APN	13 aldiz	$p < 0,001$	APN	4 aldiz	$p < 0,01$
APB	9 aldiz	$p < 0,001$	APB	Ez adierazgarria	$p > 0,05$
GAP	3 aldiz	$p < 0,01$	GAP	4 aldiz	$p < 0,01$
CAP	7 aldiz	$p < 0,01$			
DPPIV	3 aldiz	$p < 0,01$	DPPIV	Ez adierazgarria	$p > 0,05$
ACE2	4 aldiz	$p < 0,001$	ACE2	Ez adierazgarria	$p > 0,05$
ASP	3 aldiz	$p < 0,01$			
NEP	3 aldiz	$p < 0,05$			

Bestetik, lehen aipatutako salbuespena dugu, hau da, CAP peptidasaren frakzio solugarriko jarduera. Kasu honetan, aktibitatearen gorakada antzeman zen ehun tumoralean ehun normalarekiko, baino, ezberdintasun hori ez zen estatistikoki adierazgarria izan.

4.3.DATUEN BALIOZTATZEA: ESPEKTROFLUORIMETROEN KONPARAKETA



3 Irudia: (A) Mintzeko frakzioan neurtutako jarduera peptidasikoen aldaketan zenbatekoa FLUOstar Optima eta RF-540 espektrofluorimetroekin neurtua eta (B) Frakzio solugarrian neurtutako jarduera peptidasikoen aldaketan zenbatekoa FLUOstar Optima eta RF-540 espektrofluorimetroekin neurtua. Peptidasa bakoitzaren jarduera entzimatiokoaren jaitziera edo igoera ehun tumoraleko aktibitatea ehun normalekoarekiko kalkulaturik. **Gune positiboa:** ehun tumoraleko jarduera entzimatiakoa altuagoa izan zen ehun normalekoa baino. **Gune negatiboa:** ehun tumoraleko jarduera entzimatiakoa baxuagoa izan zen ehun normalekoa baino. (Larrinaga *et al.*, 2007; Varona *et al.*, 2007; Larrinaga *et al.*, 2010; Varona *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2014).

3 Irudian ikus daitekeen bezala, orokorrean jarduera entzimatiakoen aldaketek joera berdina izan zuten bi espektrofluorimetroekin, hau da, ehun tumoraleko jarduera ehun normalekoa baino baxuagoa neurtu bazen batekin, bestearekin ere gutxitzea antzeman zen, eta alderantziz. PSAren frakzio solugarria izan zen salbuespen bakarra, izan ere, lehenengo ekipoarekin tumorean ehun normalean baino aktibitate altuagoa neurtu zen eta bigarrenarekin, aldiz, baxuagoa. Orokorrean, FLUOstar Optima espektrofluorimetroarekin lortutako ezberdintasunak handiagoak eta estatistikoki adierazgarriagoak izan ziren, NEP peptidasaren mintzeko frakzioan izan ezik, RF-540arekin ezberdintasun handiagoa neurtu baitzen.

5. EZTABAIDA

5.1.JARDUERA PEPTIDASIKOA NEURTZEAREN GARRANTZIA

Sarreran aipatu bezala, gaur egunera arte ez dago markatzaile klinikorik RCCa une asintomatiko eta sendatzeko fasean detektatzeko, ezta ziurtasunez bere kurtsoa aurreikusterik ere (Hu *et al.*, 2016). Hori dela eta, azken urteotan ikerketa asko ari dira minbizi mota honen detekziorako parametro aurreikusgarri eta fidagarrien bila zuzentzen (Majer *et al.*, 2015). Helburu horrekin, entzima proteolitikoen garrantzia azpimarratu izan da, izan ere, minbiziak zabaldu eta hedatu ahal izateko beharrezkoak dituen molekulen artean kokatzen dira. Ezinbesteko funtzioa betetzen dute kartzinogenesiaren hasierako faseetan, inbasioan, angiogenesisian eta metastasian, esaterako (Matak *et al.*, 2015). Talde oso zabal eta heterogeneoa da proteasena, familia ugari barne hartzen dituen, hala nola, katepsinak, kalikreinak, mintzeko metaloproteinasak, etb. Horietako batzuk minbizi ezberdinen markatzaile gisa erabiltzen dira egun klinikan (Chamie *et al.*, 2015). Proteasen barnean sailkatzen dira lan honetan aztertutako peptidasak, eta aipatutako beste proteasa batzuek bezala funtzio garrantzitsuak betetzen dituzte prozesu fisiologikoetan eta baita patologikoetan ere, minbiziarekin erlazionatu izan direlarik (Varona *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2008; Larrinaga *et al.*, 2010; Larrinaga *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2014; Larrinaga *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2015).

Orain arte publikatutako lanetan zenbait minbizi motatan proteasen jarduera aldatuta dagoela azaldu izan da, horrela peptidasena ere aldatuta egon daitekeela pentsatu eta hala frogatu izan da (Larrinaga *et al.*, 2007; Varona *et al.*, 2007; Larrinaga *et al.*, 2010; Varona *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2014; Larrinaga *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2015). Jarduera da entzima baten funtzioak asaldaturik dauden edo ez hobekien adierazten duen parametroa, geneen eta proteinaren adierazpenak baino egokiagoa, eta beraz, lan honetan peptidasen jarduera izan da aztertua, lana, erreaktiboak eta laginak optimizatzearen.

5.2.JARDUERA PEPTIDASIKOEN ALDAKETAK CCRCCan

Ikerlan honetan aztergai izan ziren entzimen jarduerak CCRCC motako minbizian aldaketarik jasan zuten edo ez aztertzean, gehienetan aktibitatearen gora beherak gertatzen zirela ikusi zen. Eraitzen atalean azaldu bezala, jarduera peptidasiko ia guztiek jaitsiera nabarmena izan zuten ehun tumoralean inguruko ehun ez tumoralekin konparatuz, hala ere, lortutako aldaketen profilak peptidasa guztietan ez ziren berdinak izan. Salbuespena, APBaren frakzio solugarriko ehun tumoraleko jarduera izan zen, igoera jasan baitzuen. Gainera, nahiz eta, bi frakzioetan neurtu zen aktibitate peptidasikoa, orokorrean ezberdintasunak adierazgarriagoak izan ziren mintzeko frakzioan, izan ere, aztertutako entzimen kokapen nagusia mintzekoa izan ohi da, nahiz eta ia kasu guztietan jarduerak neurtu izan diren frakzio solugarrietan ere (lan honetan bezalaxe) (O’Cuinn, 1998; Valdivia *et al.*, 2004; Larrinaga *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2015). Beraz, lortutako emaitza hauek bat datoz bibliografian aurkitutako peptidasen lokalizazioarekin.

Orain, ikerlan honetan aztertutako peptidasa bakoitzaren jardueraren aldaketak banan-banan eztabaidatuko dira.

PSAren funtzio nagusia peptido bioaktiboen erregulazio da, beraz, lan honetan neurtutako bere jardueraren jaitsierak peptido horien kontzentrazioen gorakada eragingo du. Bere substratuen artean, besteak beste, angiotentsinaren metabolismoko konposatuak daudenez, beren kontzentrazioen igoerak kartzinogenesisia bultzatuko du (Varona *et al.*, 2007). Frakzio solugarrian ere, mintzekoan bezalaxe, jardueraren jaitsiera neurtu zenez, pentsa liteke gune zitoplasmatikotik jariatua dela PSA eta gune extrazelularrean mintzeko erregulazio peptidikoaren antzera jokatzen duela.

Nahiz eta APNaren presentzia klasikoki neoplasien sorreran laguntzen duten zenbait prozesurekin erlazionatu izan den, entzima hau ez da adierazten zenbait ehun tumoraletan (Dixon *et al.*, 1994). Horrek adierazi lezake APNak kasu horietan beste rol bat lukeela, sistema peptidikoetan beste asaldura batzuk eraginez (Rangel *et al.*, 2007). Gure emaitzek bigarren zentzu honetara jotzen dute, izan ere, APNaren jarduera entzimatikoa jaitsi egin zen ehun tumoralean. Frakzio solugarriko peptidasa honen aktibitateak ere jaitsiera jasan zuen aurreko kasuan bezala, peptidasa jariatua

dela pentsa daitekeelarik. Gainera, domeinu intrazitoplasmatikoa duela deskribatu izan da eta beraz, hartzaile funtzioa ere bete dezake (Riemann *et al.*, 1999).

Prozesu neoplasikoak bultzatzen dituzten APBaren ekintza fisiologiko ugari deskribatu izan dira, besteak beste hantura prozesuak, itzulpen osteko heldzea, mintz plasmakoaren erregulazioa eta peptido bioaktiboen erregulazioa. Erregulatzen dituen peptidoen artean daude bere substratu nagusia diren bradikininak (Foulon *et al.*, 2004), baita angiotentsinaren metabolismoko konposatuak ere (Varona *et al.*, 2007). Lan honetan neurtutako APBaren jardueraren jaitsieraren ondorioz emandako substratu horien kontzentrazioen igoerek tumorearen sorrera bultzatzen duten prozesuak indartuko dituzte. Frakzio solugarriko peptidasak ere jaitsiera jasan zuen eta beraz, mintzeko frakziokoen ekintza berberak esleitu dakizkioke frakzio solugarriko APBari.

GAPak angiotentsina IIa du substratutzat, eta beraz, molekula horrekin burututako tumore hazkuntza eta inbasibotasuna kontrolatzen ditu. Lan honetan neurtutako GAParen azpi-erregulazioak angiotentsina intrarenalen metabolismoaren desoreka aditzera ematen du, prozesu neoplasikoak bultzatzen direlarik (Blanco *et al.*, 2014). Kasu honetan ere frakzio solugarriko GAParen jarduerak jaitsiera jasan zuen, beraz, peptidasa gune extrazelularrera jariatua dela pentsa daiteke.

Ikerlan honetan neurtutako CAParen jardueraren jaitsierak ehun tumoralean ehun normalarekiko, kontrolatzen dituen peptidoen kontzentrazioen igoerak eragin ditzake, besteak beste bere substratu nagusia den basopresinarena (Nomura *et al.*, 2004), garapen tumorala bultzatuz. Izan ere, substratu horiek zelularen biziraupena sustatu eta zatiketa zelularra, zein angiogenesisia estimulatzen dituzte. Kasu honetan, frakzio solugarrian CAParen jardueraren igoera neurtu zen, beraz, ez zen mintzeko frakzioko aldaketa bera antzeman eta pentsa daiteke peptidasa solugarri hau giltzurruneko kartzinogenesisian inplikaturik dagoela peptidoen akzio intrakrinoaren erregulazioa burutuz (Re eta Cook, 2006; Re, 2011). Azkenik, peptidasa honek domeinu intrazitoplasmatikoa du, eta beraz, hartzaile funtzioa bete dezakeela deskribatu izan da (Riemann *et al.*, 1999).

Autore batzuen arabera, DPPIVak efektu antitumoralak ditu zenbait ehunetan eta bere jaitsierak hazkuntza zelularra, angiogenesisia eta tumoreen inbasibotasuna

handiagotzen ditu, besteak beste, peptido bioaktiboen erregulazio asaldatur. Izan ere, bere substratuen artean kartzinogenesisia bultzatzen dutenak daude, esaterako, zitokinak eta kimokinak (Havre *et al.*, 2008; Arscott *et al.*, 2009). Beraz, lan honetan neurtutako peptidasa honen jardueraren gutxitzeak peptido horien kontzentrazioen gorakada ekarriko luke, minbiziaren garapena bultzatuz. Kasu honetan ere frakzio solugarrian DPPIVaren jardueraren jaitsiera antzeman zen bertako peptidasek gune extrazelularrean jarduten dutela pentsaraziz. Gainera, entzima hau atxikidura molekula bezala deskribatua izan da (Riemann *et al.*, 1999; Carl-McGrath *et al.*, 2006).

ACE2ak efektu antiproliferatiboak ditu egoera normaletan, beraz, bere espresioa jaistean (lan honetako emaitzetan) zelulen proliferazioa bultzatuko litzateke, horrela tumorearen sorrera eta garapena indartuz. GAParen kasuan bezalaxe, bere substratua tumore hazkuntza eta inbasibotasuna kontrolatzen dituen angiotentsina IIa da, alegia (Larrinaga *et al.*, 2010). Frakzio solugarriko peptidasek ere jaitsiera jasan zuten, aurretik azaldutako ia peptidasa guztien egoeran leudeke frakzio solugarriko ACE2ak ere, hau da, gune extrazelularreko peptido bioaktiboen erregulazioan inplikatur.

Neurtu zen ASParen jardueraren jaitsierak ehun tumoralean ehun normalarekiko, kontrolatzen dituen peptidoen kontzentrazioen igoerak eragin ditzake, eta ondorioz, sistema peptidokoen asaldura, garapen tumorala bultzatuz. Honen substratua, aurrerago azaldutako beste peptidasa batzuen bezala angiotentsina IIa delako, alegia (Larrinaga *et al.*, 2010).

Aztertutako NEParen ehun tumoraleko jardueraren jaitsierak ere kontrolatzen dituen peptidoen kontzentrazioen igoerak eragin ditzake garapen tumorala bultzatuz, bere substratu baitira tumoreen proliferazioa bultzatzen duen bonbesinaren antzekoak diren konposatuak, esaterako (Heuser *et al.*, 2005). Gainera, peptidasa honek domeinu intrazitoplasmatikoa duela eta beraz, hartzaile funtzioa bete dezakeela deskribatu izan da (Riemann *et al.*, 1999).

Azkenik, peptido bioaktiboen erregulazioaz eta peptidasen funtzio ez katalitikoetz gain, sarreran azaldu bezala, peptidasek beren aktibitate katalitikoari esker matrizearen degradazioan ere parte hartzen dute. Gure emaitzek ez dute aditzera ematen aztertutako peptidasek inplikaziorik dutenik ekintza horretan, izan ere, horien

jarduera baxuagoa da ehun tumoralean inguruko ehun normalean baino. Hala ere, aurretik argitaratutako zenbait lanetan ikusi izan da peptidasa horien jarduerak fase berantiarretan goiztiarretan baino altuagoak direla eta beraz, orduan bai, kontuan hartu beharko litzatekeela beren matrizea degradatzeko, eta beraz, zelula tumoralak gorputzean zehar hedatzen laguntzeko duten ahalmena (Petraiki *et al.*, 2006; Varona *et al.*, 2010; Larrinaga *et al.*, 2012; Blanco *et al.*, 2014).

5.3.DATUEN BALIOZTATZEA: ESPEKTROFLUORIMETROEN KONPARAKETA

Lan osoan zehar adierazi bezala, ikerketa honen helburuetako bat bi ekipo ezberdinekin aurretik egindako esperimentuetan lortutako emaitzak eta orain lortutakoak konparatzea da. Emaitza hauek eztabaidatu aurretik, lehenagoko esperimentuen eta ikerlan honetakoen arteko ezberdintasunak kontsideratu behar dira, akats iturria izan daitezkeelako, eta beraz, emaitza berdinak ez lortzea eragin dezaketelako. Alde batetik, aztertutako laginak ez ziren berdinak izan, hori dela eta, emaitzei erreparatzerakoan kontuan hartu beharko da indibiduo ezberdinen arteko aldakortasuna. Gainera, entsegu entzimatiakoak burutu aurretik egindako laginen prestaketak ere eragin dezake emaitzetan, izan ere, ez ziren batera prestatu lagin guztiak eta horrek azkenean lortutako frakzioen arteko aldakortasuna dakar, besteak beste, manipulazioak pertsona ezberdinek eta baldintza ezberdinetan burutu zituztelako. Azkenik, substratuen sentikortasuna eta entseguetan aplikatutako baldintza gogorrek kontsideratu behar dira. Beraz, bi espektrofluorimetroekin lortutako emaitzak konparatzeko, onena, lagin berdinak aztertzea eta beren prozesamendua eta entseguak aldi berean egitea litzateke, baina hori ez zen posible izan ikerlan honetan.

Akats horiek egiteko arriskua izanda ere, bi ekipoen emaitzek peptidasen jardueren aldaketen joera berdina erakutsi zuten orokorrean, hau da, lan honen aurretik argitaratutako ikerketetan (RF-540 ekipoarekin) ehun tumoralean peptidasen jarduera entzimatiakoaren jaitsiera neurtu bazen ehun normalarekin konparatuz, lan honetan ere (FLUOstar Optima ekipoarekin) jaitsiera neurtu zen, eta alderantziz. Joeren berdintasun horretan salbuespen bat ageri da ordea, PSAren frakzio solugarriko jarduerarena, hain zuzen ere.

Bi espektrofluorimetroek, beraz, orokorrean kualitatiboki berdin funtzionatzen dutela onar daiteke, joera berdina neurtzen dituztelako. Aldiz, kuantitatiboki ez dute berdin funtzionatzen, orokorrean (NEParen kasua salbuespenzat hartuta zeinetan ezberdintasun handiagoa neurtu den RF-540arekin) askoz emaitza esanguratsuago edo adierazgarriagoak eskuratu baitziren bigarren ekipoarekin. Beraz, zehaztasunaren aldetik askoz egokiagoa litzateke FLUOstar Optima erabiltzea ahal den kasuetan, askoz sentikorragoa dela frogatu baitzen. Hori gutxi balitz, aipagarria da bigarren ekipoak lehengoarekiko abantaila ugari dituela, sarreran azaldu direnak, eta beraz, emaitzen kalitatea hobetzeaz gain, ikerlarien lana eta denbora eta laborategian beharko diren aparatu kopurua optimizatzen dituela.

Bi ekipoen funtzionamenduen berdintasun horretan bada ordea salbuespen bat, lehenago aipatu bezala, PSAren frakzio solugarriko jarduera alegia. Akatsa non egin izan zen pentsatzerako orduan atal honen hasieran planteatutako aldagaiak kontsideratu behar dira, eta beraz, lehen esan bezala, kontraesan hau konpontzeko egokiena esperimientua aurreko lanetan erabilitako lagin eta baldintza berdinetan errepikatzea litzateke. Hala ere, kontraesan hau salbuespen bezala hartuko da, izan ere, 12 kasuetatik bakarra izan zen, eta beraz, orokorrean, esan daiteke, helburu bezala finkatutako bi parametroen kontrolak ondo egin zirela. Alde batetik, aurreko lanetan lortutako emaitzak balioztatu ziren (Larrinaga *et al.*, 2007; Varona *et al.*, 2007; Larrinaga *et al.*, 2010; Varona *et al.* 2010; Blanco *et al.*, 2014) eta beraz, lagin ezberdinekin burututako neurketak konparagarriak dira. Bestetik, teknika bera balioztatu zen, hau da, FLUOstar Optima eta RF-540 espektrofluorimetroek berdin funtzionatzen dutela.

Alde batetik, aurretik argitaratutako emaitzak baieztatu egin ziren. Hau oso emaitza garrantzitsua da, izan ere, ez ziren lagin eta baldintza berdinak erabili ikerketa guztietan, hori horrela izanik, emaitzak berdinak izaten jarraitzeak asko indartzen du peptidasen diagnostiko eta pronostikorako erabilgarritasuna. Indibiduo ezberdin askotan egin izan dira entsegu peptidasikoak azken urteotan zehar eta emaitzek betiere joera berdina erakutsi izan dute. Ondorioz, CCRCC minbizi mota aldakorren ulermenean eta ezagutzan izugarritzko aurrerakada ari da izaten entzima horien ikerketa, parametro errepikakor eta neurgarri bezala planteatzen baitira.

Bestetik, bi ekipoen funtzionamendu parekoaren kontrola burutu zen, hau da, teknikak balioztatu ziren. Horrek argi erakusten du uneoro ikerkuntzaren eta teknologiaren alorretan egiten diren aurrerapausoen indarra. Izan ere, gero eta aparatu eta teknika zehatzago eta erosoagoak ari dira garatzen, zeina ezinbestekoa den zientziak aurrera jarrai dezan. Garapen horiek, orain arte lortutako informazioaz haratago ikertu eta aurkitu ahal izateko oinarriak eskaintzen dituzte, ezagutza zabalduz eta lana optimizatuz. Etengabeko berrikuntzen adibide da, beraz, FLUOstar Optima espektroflurimetroa, izan ere, emaitza zehatzagoak eskuratzea baimentzen du lana, denbora eta beharrezko ekipamendua aurreztuz, besteak beste, entsegu gehiagoren irakurketa baimenduz denbora gutxiagoan eta aparatu berean hainbat parametro eta substantzia neurtzea baimenduz.

6. ONDORIOAK

- 1) FLUOstar Optima espektroflurimetroarekin neurtutako peptidasen jarduera entzimatiakoei CCRCC minbiziko laginetan aldaketak jasan dituzte ehun ez tumoralarekiko, bai mintzeko frakzioan eta baita frakzio solugarrian ere.
- 2) Neurtutako peptidasen jardueren aldaketak ehun tumorelean ehun normalarekiko ez dira zehazki berdinak izan baina joera berdina izan dute orain arte argitaratutako lanekin alderatuta. Beraz, CCRCCaren diagnosirako eta pronostikorako parametro erabilgarri bezala planteatu daiteke jarduera peptidasikoen azterketa.
- 3) Konparatutako bi ekipoei teknika parekoak dituzte. Hala ere, FLUOstar Optima RF-540 baino sentikorragoa da eta gainera, hainbat abantaila eskaintzen ditu, besteak beste, lana, denbora eta ekipamendua aurrezteko aukera.
- 4) Etorkizunean, ikerketa lan honetan sakontzeko, interesgarria litzateke dagokigun minbizi motan garrantzitsuak diren beste peptidasa batzuk aztertzea eta peptidasen ikerketa hain ohikoak ez diren beste giltzurruneko minbizi mota batzuetara zabaltzea, betiere berrikuntza tekniko eta teknologikoez baliatuz, ahalik eta informazio gehiena lortu eta aurrerapauso handienak eman ahal izateko.

7. BIBLIOGRAFIA

Alba, F., Iribar, C., Ramirez, M., Arenas, C. 1989. A fluorimetric method for the determination of brain aminopeptidases. *Arch. Neurobiol.* 52: 169-173.

Antczak, C., De Meester, I., Bauvois, B. 2001. Ectopeptidases in pathophysiology. *BioEssays.* 23: 251-260.

Arcscott, W. T., LaBauve, A. E., May, V., Wesley, U. V. 2009. Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. *Oncogene.* 28: 479-491.

Bedke, J., Gauler, T., Grünwald, V., Hegele, A., Herrmann, E., Hinz, S., Janssen, J., Schmitz, S., Schostak, M., Tesch, H., Zastrow, S., Miller, K. 2016. Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *World Journal of Urology.* 1-10.

Blanco, L., Larrinaga, G., Pérez, I., López, J. I., Gil, J., Agirregoitia, E., Varona, A. 2008. Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 294: 850-858.

Blanco, L., Sanz, B., Perez, I., Sánchez, C. E., Cándenas, M. L., Pinto, F. M., Gil, J., Casis, L., López, J. I., Larrinaga, G. 2014. Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms. *BMC Cancer.* 14: 386.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72: 248-254.

Cairns, P. 2011. Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biomark.* 9: 461-473.

Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Röcken, C. 2006. Ectopeptidases in tumour biology: A review. *Histol. Histopathol.* 21: 1339-1353.

Chamie, K., Klöpfer, P., Bevan, P., Störkel, S., Said, J., Fall, B., Beldegrun, A. S., Pantuck, A. J. 2015. Carbonic anhidride-IX score is a normal biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. *Urol. Oncol.* 33: 204. e25-33.

Dixon, J., Kaklamanis, L., Turley, H., Hickson, I. D., Leek, R. D., Harris, A. L., Gatter, K. C. 1994. Expression of aminopeptidase-N (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. *J. Clin. Pathol.* 47: 43-47.

Ferro, E. S., Hyslop, S., Camargo, A. C. M. 2004. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. *J. Neurochem.* 91: 769-777.

Florentin, D., Sassi, A., Roques, B. 1984. A highly sensitive fluorimetric assay for "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that releases Tyr-Gly-Gly from enkephalins. *Annal. Biochem.* 141: 62-69.

Foulon, T., Cadel, S., Piesse, C., Cohen, O. 2004. Aminopeptidase B. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (Ed.), *Handbook of Proteolytic Enzymes-en*, 2. ed. Elsevier Academic Press, 328-332.

- Havre, P. A., Abe, M., Urasaki, Y., Ohnuma, K., Morimoto, C., Dang, N. H. 2008. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front. Biosci.* 13: 1634-1645.
- Heasley, L. E. 2001. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene.* 20: 1563-1569.
- Heuser, M., Schlott, T., Schally, A. V., Kahler, E., Schliephake, R., Laabs, S. O., Hemmerlein, B. 2005. Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J. Urol.* 173: 2154-2159.
- Hu, S. L., Chang, A., Perazella, A., Okusa, M. D., Jaimes, E. A., Weiss, R. H. 2016. The Nephrologist's Tumor: Basic Biology and Management of Renal Cell Carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27.
- Huang, Y., Simms, A. E., Mazur, A., Wang, S., León, N. R., Jones, B., Aziz, N., Kelly, T. 2011. Fibroblast activation protein- α promotes tumor growth and invasion of breast cells through non-enzymatic functions. *Clin. Exp. Metastasis.* 28: 567-579.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Mitchell, R. N. 2008. Riñón y Vía Urinaria. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Mitchell, R. N. (Ed.), *Robbins, Patología Humana-n*, 9. ed. Elsevier Saunders, 587-590.
- Larrinaga, G., Blanco, L., Errarte, P., Beitia, M., Sanz, B., Perez, I., Irazusta, A., Sánchez, C. E., Santaolalla, F., Andrés, L., López, J. I. 2013. Altered Peptidase Activities in Thyroid Neoplasia and Hyperplasia. *Dis. Markers.* 35: 825-832.
- Larrinaga, G., Blanco, L., Sanz, B., Perez, I., Gil, J., Unda, M., Andrés, L., Casis, L., López, J. I. 2012. The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 303: 1584-1591.
- Larrinaga, G., Callado, L. F., Agirregoitia, N., Varona, A., Gil, J. 2005. Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain. *Neurosci. Lett.* 383: 136-140.
- Larrinaga, G., López, J. I., Casis, L., Blanco, L., Gil, J., Agirregoitia, E., Varona, A. 2007. Cystinyl aminopeptidase activity is decreased in renal cell carcinomas. *Regul. Pept.* 144: 56-61.
- Larrinaga, G., Perez, I., Sanz, B., Beitia, M., Errarte, P., Fernández, A., Blenco, L., Etxezarraga, M. C., Gil, J., López, J. I. 2015. Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis. *PLoS One.* 10: e0119436.
- Larrinaga, G., Perez, I., Sanz, B., Blanco, L., López, J. I., Cándenas, M. L., Pinto, F. M., Gil, J., Irazusta, J., Varona, A. 2010. Angiotensin-converting enzymes (ACE and ACE2) are downregulated in renal tumors. *Regul. Pept.* 165: 218-223.
- Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Montironi, R., Kirkali, Z. 2006. 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *Eur. Urol.* 49: 798-805.
- Majer, W., Kluzek, K., Bluysen, H., Wesoly, J. 2015. Potential Approaches in Biomarker Discovery in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Cancer.* 6: 1105-1113.
- Mantle, D., Lauffart, B., McDermott, J., Gibson, A. 1990. Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clin. Chim. Acta.* 187: 105-113.

- Matak, D., Szymanski, L., Szczylik, C., Sledziewski, R., Lian, F., Bartnik, E., Sobocinska, A., Czarnecka, A. M. 2015. Biology of renal tumour cancer stem cells applied in medicine. *Contemp. Oncol.* 19 (1A): A44-A51.
- Miyajima, A., Yazawa, S., Kosaka, T., Tanaka, N., Shirotake, S., Mizuno, R., Kikuchi, E., Oya, M. 2015. Prognostic Impact of Renin-Angiotensin System Blockade on Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Ann. Surg. Oncol.* 22: 3751-3759.
- Nomura, S., Ito, T., Mizutani, S. 2004. Placental leucine aminopeptidase. Hooper, N. M., Lendeckel, U, (Ed.), *Aminopeptidases in biology and disease-en.* Kluwer Academic/Plenum Press, 45-59.
- O’Cuinn, G. 1998. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 279-292.
- Perez, I., Blanco, L., Sanz, B., Errarte, P., Ariz, U., Beitia, M., Fernández, A., Loizate, A., Candenas, M. L., Pinto, F. M., Gil, J., López, J. I., Larrinaga, G. 2015. Altered Activity and Expression of Cytosolic Peptidases in Colorectal Cancer. *Int. J. Med. Sci.* 12: 458-467.
- Petraki, C. D., Gregorakis, A. K., Vaslamatzis, M. M., Papanastasiou, P. A., Yousef, G. M., Levesque, M. A., Diamandis, E. P. 2006. Prognostic implications of the immunohistochemical expression of human kallikreins 5, 6, 10 and 11 in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 27: 1-7.
- Rangel, R., Sun Y., Guzman-Rojas, L., Ozawa, M. G., Sun, J., Giordano, R. J., Van Pelt, C. S., Tinkey, P. T., Behringer, R. R., Sidman, R. L., Arap, W., Pasqualini, R. 2007. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 4588-4593.
- Re, R. N. 2011. Noncanonical intracrine action. *J. Am. Soc. Hypertens.* 5: 435-448.
- Re, R. N., Cook, J. L. 2006. An intracrine view of angiogenesis. *BioEssays.* 28: 943-953.
- Riemann, D., Kehlen, A., Langner, J. 1999. CD23-not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today.* 20: 83-88.
- Sanz, B., Perez, I., Beitia, M., Errarte, P., Fernández, A., Blanco, L., Estalella, I., Loizate, A., Irazusta, J., López, J. I., Larrinaga, G. 2015. Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J. Investig. Med.* 63: 740-746.
- Shrimpton, C. N., Smith, A. I., Lew, R. A. 2002. Soluble Metalloendopeptidases and Neuroendocrine Signaling. *Endocr. Rev.* 23: 647-664.
- Silveira, P. F., Irazusta, J., Gil, J., Agirregoitia, N., Casis, L. 2001. Interactions among challenges of hydromineral balance, angiotensin-converting enzyme, and cystine aminopeptidase. *Peptides.* 22: 2137-2144.
- Speth, R. C., Karamyan, V. T. 2008. The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart Fail. Rev.* 13: 299-309.
- Sumitomo, M., Shen, R., Nnaus, D.M. 2005. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *BBA-PROTEINS PROTEOM.* 1751: 52-59.
- Taylor, A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* 7: 290-298.

Valdivia, A., Irazusta, J., Fernández, D., Múgica, J., Ochoa, C., Casis, L. 2004. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regul. Pept.* 122: 79-84.

Varona, A., Blanco, L., López, J. I., Gil, J., Agirregoitia, E., Irazusta, J., Larrinaga, G. 2007. Altered levels of acid basic and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292: 780-788.

Varona, A., Blanco, L., Perez, I., Gil, J., Irazusta, J., López, J. I., Candenias, M. L., Pinto, F. M., Larrinaga, G. 2010. Expression and activity profiles of DPPIV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer.* 10: 193.

8. WEBGRAFIA

BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader. Sarrera data: 2016ko ekainak 1. <https://www2.le.ac.uk/departments/csmm/documents/BMG%20Microplate%20Reader.pdf-en> eskuratua.

Cáncer. 2015. Organización Mundial de la Salud. Sarrera data: 2016ko martxoak 21. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/-en> eskuratua.

Factors affecting enzyme activity. Nuffield Foundation. Sarrera data: 2016ko ekainak 1. <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/factors-affecting-enzyme-activity-en> eskuratua.

Hejmadi, M. 2010. Introduction to Cancer Biology, 2. ed. Bookboon.com. Sarrera data: 2016ko martxoak 21. <http://csbl.bmb.uga.edu/mirrors/JLU/DragonStar2015/download/introduction-to-cancer-biology.pdf-en> eskuratua.

Kidney Cancer (Adult)–Renal Cell Carcinoma. 2014. American Cancer Society. Sarrera data: 2016ko ekainak 3. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003107-pdf.pdf.-en> eskuratua.

Sachdeva, K., Curti, B., Jana, B. R. P., Harris, J. E., Hu, W., Javeed, M., Makhoul, I., Perry, M., Talavera, F. 2009. Renal Cell Carcinoma. *eMedicine.* Sarrera data: 2016ko martxoak 21. <http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview-en> eskuratua.

Shimidazu RF-540 espectrofotómetro de fluorescencia. Sarrera data: 2016ko ekainak 1. <http://www.justdocument.com/download/2050951999/shimidazu-rf-540-espectrofotometro-de-fluorescencia/-en> eskuratua.

Sousa, M. J., Malcata. F. X. 1996. Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extracts of *Cynara cardunculus* L. Sarrera data: 2016ko apirilak 1. <http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/6598/1/Effects%20of%20processing%20conditions....pdf-en> eskuratua.

1 ERANSKINA

1 Taula: Aparatuak, soluzioak eta produktuak zein errektiboak. (A) Aparatuak. Aparatu-modeloa eta aparatu-marka. **(B)** Soluzioak eta horiek prestatzeko erabilitako osagaiak. **b/b** = bolumena/bolumena. **p/b** = pisu/bolumena. **(D)** Errektiboen eta produktuen hornitzaileak, hala nola, jatorrizko hiria eta lurraldea.

(A) Aparatuak	Modeloa. Marka
Espektrofotometroa	FLUOstar Optima (BMG Labtech)
Espektrofluorimetroa	FLUOstar Optima (BMG Labtech)
Inkubagailu lehorra	Hotcold S, 0-60°C. Selecta
pHmetroa	Micro-pH 2002. Crison.
Termoegonkortutako irabiagailu magnetikoa	Agimatic
Ultraizozgailua	MDF-U5 186 S. Sanyo
Ultraturrax homogeneizagailua	Micra D1. ART
Ultrazentrifuga	Centrikon T2190
Angelu finkoko errotorea	TFT 45.6. Kontron
Zehaztasunezko balantza	R180D. Sartorius
Zentrifuga	Labofuge 200. Heraeus

(B) Soluzioak	Osagaiak
Tris-HCl Indargetzailea 0,2 M, (pH 7,4)	1000 ml H ₂ O
Homogeneizazio soluzioa, Tris-HCl 10 mM	24,22 g TRIZMA-base % 5 Tris-HCl 0,2M
Fosfato Indargetzailea 0,1 M (pH 7,4)	18,7 ml A + 81,3 ml B
A fosfatao	1000ml H ₂ O 27,6 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 0,2 M
B Fosfatao	1000 ml H ₂ O 28,4 g NaH ₂ PO ₄ 0,2M 0,117 mM Coomasie
Bradford errektiboa	% 5 (b/b) Etanola % 15 (p/b) H ₃ PO ₄

(D) Errektiboak eta Produktuak	Hornitzailea Hiria, Lurraldea
Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT)	
Cys-β-naftilamida	Bachem
H-Glu-β-naftilamida	Bubendorf, Suitza
H-Gly-Pro-β-naftilamida	

Ala- β -naftilamida	
Arg- β -naftilamida	
Asp-AP- β -naftilamida	
Azido piroglutamiko- β -naftilamida	
Behi-seroalbumina (BSA)	
Captopril	
Coomasie urdin distiratsua G-250	Sigma-Aldrich
Dimetil-sulfoxidoa (DMSO)	Steinheim, Alemania
DL-ditioeitrola (DTT)	
Kaltzio kloruroa (CaCl ₂)	
N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO ₂ -Phe-Gly (DAGNPG)	
Puromizina	
Tris (hidroximetil) aminometazola (Tris-base)	

Azido ortofosforikoa (H ₃ PO ₄)	
EDTA	
Etanol absolutua (CH ₃ CH ₂ OH)	
Magnesio kloruroa (MnCl ₂)	Merck
Sodio-azetato trihidratatua (CH ₃ COONa * 3H ₂ O)	Darmastdt, Alemania
Sodio fosfato dibasikoa (NaH ₂ PO ₄)	
Sodio fosfato monobasiko monohidratatua (Na ₂ HPO ₄)	
Sodio kloruroa (NaCl)	

Azido klorhidrikoa (HCl)	Panreac
	Bartzelona, Espainia

2 ERANSKINA

2 Taula: Jarduera entzimatikoa zehazteko erabilitako soluzioen osaera. Kasu guztietan jasotako 0,1 mg/ml kontzentrazioan. **(A)** Substratuak 50 mM fosfato indargetzailetan (pH 7,4) prestatuak. **(B)** Substratuak 50 mM Tris-HCl indargetzailetan (pH 7,4) prestatuak. **NA** = nafilamida.

(A)	Substratua	mM	pH	DTT (mM)	CaCl₂ (mM)	NaCl (mM)	Puromizina (μM)
PSA	Ala- β -NA	2	7,4	1,2			
APN	Ala- β -NA	2	7,4	1,2			40
APB	Arg- β -NA	2	6,5			150	40
GAP	Glu- β -NA	0.227	7,4	0,65	0,5		

(B)	Substratua	mM	pH	NaCl	MnCl₂ (mM)	Captopril (nM)
CAP	Cys-di- β -NA	0,135	5,9			
DPPIV	H-Gly-Pro- β - NA	2	8,3			
ACE2	SPNPT	0,5	7,4			
ASP	Asp- β -NA	0,168	7,4		1	
NEP	DAGNPG	1	7,4			4,6

3 ERANSKINA

3 Taula: Esperimentuetan lortutako peptidasa bakoitzaren jardueraren emaitza numerikoak ehun tumoralean eta ehun normalean; mintzeko frakzioan eta frakzio solugarrian. Bataz bestekoa \pm ES adierazia. p = adierazkortasun estatistikoa. (n=13). Jarduera entzimatikoa PU (hidrolizatutako pikomol substratu fluorogeniko/min) mg proteinako adierazita.

Peptidasa	Frakzioa	Ehun tumorala (CCRCC)	Ehun normala	p
PSA	Mintzeko gunea	9213,49 \pm 1883,4	79777,62 \pm 14708,19	0,000
	Gune solugarria	6424,4 \pm 1530,4	14208,3 \pm 3143,27	0,043
APN	Mintzeko gunea	9617,86 \pm 2971,85	122434,54 \pm 23496,41	0,000
	Gune solugarria	4168,94 \pm 830,99	17931,58 \pm 3431,42	0,001
APB	Mintzeko gunea	9359,04 \pm 2279,44	82487,31 \pm 14407,68	0,000
	Gune solugarria	26537,99 \pm 7387,99	39778,31 \pm 6111,21	0,064
GAP	Mintzeko gunea	8810,11 \pm 1572,23	26160,67 \pm 6165,8	0,019
	Gune solugarria	2531,55 \pm 662,25	10316,23 \pm 1956,62	0,001
CAP	Mintzeko gunea	629,36 \pm 130,6	4481,92 \pm 1043,3	0,001
	Gune solugarria	3369,46 \pm 655,6	3278,69 \pm 547,73	0,916
DPPIV	Mintzeko gunea	59408,82 \pm 11766,31	157349 \pm 25513,21	0,002
	Gune solugarria	22406,55 \pm 5730,69	37866,46 \pm 6410,72	0,085
ACE2	Mintzeko gunea	170,23 \pm 52,99	605,85 \pm 83,07	0,000
	Gune solugarria	310,64 \pm 59,85	465,77 \pm 44,52	0,050
ASP	Mintzeko gunea	693,9 \pm 137,73	2068 \pm 448,18	0,003
NEP	Mintzeko gunea	346,83 \pm 98,38	944,18 \pm 220,29	0,023