

Efecto del Extracto de Fresa Irradiado con Luz Ultravioleta sobre la Expresión de Proteínas en Hígado de Ratas Obesas Alimentadas con Dieta Alta en Grasa

Pedro Ulises Muñoz González (1), Victoriano Pérez Vázquez (2)

¹ [Licenciatura en Ing. Biomédica, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [munozgp2011@licifug.ugto.mx]

² [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [vicpe@yahoo.com]

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto del extracto de fresa irradiado con luz UV sobre la expresión de proteínas en hígado de ratas obesas alimentadas con dieta alta en grasa. Se utilizaron 4 grupos de ratas wistar macho (n=3 por grupo), un grupo control, un grupo obeso, un grupo obeso tratado con extracto de fresa y un grupo obeso tratado con extracto de fresa irradiado con luz UV. Se generó el perfil proteico mediante 2D-PAGE a partir de las muestras del hígado. Los geles se digitalizaron y se analizaron en el software Image Master 2D Platinum. Se obtuvieron 9 diferencias significativas, de las cuales 5 aparecieron de *novo* en las ratas tratadas con extracto de fresa irradiada y 4 spots disminuyeron en las ratas obesas e incrementaron en los grupos tratados. Es importante identificar las proteínas con cambios de expresión diferencial para encontrar su relevancia funcional en la obesidad y así entender el efecto del extracto de fresa irradiado en esta enfermedad.

Abstract

This study had the objective to analyze the effect of the strawberry extract irradiated with UV light on the protein expression of high fat diet fed rat's liver. They were used 4 groups of male Wistar rats (n=3 per group), one control group, one obese group, one obese group treated with strawberry extract and one obese group treated with strawberry extract irradiated with UV light. It was generated the protein profile with 2D-PAGE since the liver samples. The gels was digitalized and analyzed in the Image Master 2D Platinum software. They were obtained 9 main differences, of which 5 appear de novo on the strawberry irradiated extract treated rats and 4 spots decreased on the obese rats and increment on the treated groups. Is important to identify the proteins with differential expression changes to find its functional relevance on the obesity and thus understand the effect of the irradiated strawberry extract on this disease.

Palabras Clave

Estrés oxidativo, Expresión proteica, Extracto de fresa, Luz UV, Obesidad

INTRODUCCIÓN

La obesidad como factor que desencadena el estrés oxidativo.

La obesidad es el principal factor causante de síndrome metabólico, esto debido a que la acumulación de grasa está directamente relacionada con el estrés oxidativo [1,2]. Los adipocitos producen una serie de moléculas tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), que contribuyen al desarrollo de alteraciones como resistencia a la insulina y trombosis respectivamente [2].

Una alta ingesta de componentes antioxidantes y bioactivos juega un rol clave en la prevención de ciertas enfermedades, tales como diabetes tipo 2 debido a que componentes como los polifenoles incrementan la transcripción del factor 2 relacionado al factor-eritroide nuclear (Nrf2), el cual desencadena la respuesta antioxidante celular mediante la activación de enzimas relacionadas a esta función. Aunado a sus propiedades antioxidantes, los polifenoles tienen un efecto indirecto sobre los proliferadores de los receptores peroxisomales (PPARs), cuya función involucra el manejo de la sensibilidad a la insulina, la homeostasis de la glucosa, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de lípidos [3].

La fresa como alimento rico en antioxidantes y su potenciación mediante luz UV

La fresa es un alimento comúnmente consumido debido a su alto contenido de nutrientes y fitoquímicos benéficos, los que aparentemente desempeñan un papel importante en la actividad biológica humana [3-5]. Entre los componentes fenólicos que brinda la fresa, los más abundantes

son las antocianinas (41%), flavon-3-oles (28%), elagitaninos (14%), conjugados de ácido cinámico (13%), flavonoles (3%) y conjugados de ácido elálgico (1%) [4].

Se ha visto que el irradiar frutos como la fresa con luz UV-C (100-280nm), ha demostrado ser una buena alternativa para potenciar la producción de antioxidantes por parte de estas, llegando al grado de incrementar el contenido de estos en un 199 \pm 66% promedio [6]. Aunado a esto se ha confirmado que la fresa irradiada posee mayor capacidad antioxidante que la que no ha sido tratada, además de que presenta una mayor resistencia al deterioro debido a la actividad germicida de la luz UV-C entre otros factores [7-10].

Análisis proteómico por electroforesis 2D

La electroforesis en 2 dimensiones es una de las técnicas más utilizadas en proteómica, esta consiste en la separación de proteínas a partir de una solución homogénea, posteriormente se llevan a cabo 2 etapas de separación mediante el uso de geles de poliacrilamida, la primera etapa consiste en la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico mediante un gradiente de pH inmovilizado, posteriormente la segunda etapa consiste en una electroforesis tradicional en la cual se separan las proteínas por su peso molecular, en ambos casos se utiliza una diferencia de potencial eléctrico para facilitar el movimiento proteico [11,12].

Por lo tanto este trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto del extracto de fresa irradiado con luz UV sobre la expresión de proteínas en hígado de ratas obesas alimentadas con dieta alta en grasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción fenólica de proteínas

Se obtuvieron muestras de hígado de grupos de ratas control (C), obesas (O), obesas alimentadas con extracto de fresa (EF) y obesas alimentadas con extracto de fresa irradiada con luz UV (EFI), del tipo Wistar (macho, Edad 1 mes). Estas se homogeneizaron (1g muestra/5ml buffer de extracción, 4°C, 10min, agitación constante), el homogeneizado se mezcló con solución de fenol saturado en agua (1:1), la fase fenólica se obtuvo mediante centrifugación diferencial (7000 rpm, 10min), la fase fenólica se precipitó en 5 volúmenes de 0.1 M de acetato de amonio en metanol (-20°C, toda la noche), la solución se centrifugó (7000 rpm, 15min) y el precipitado se lavó tres veces con acetato de amonio en metanol (7000 rpm, 10min) y 1 con acetona (80%, 7000 rpm, 10min), se secó el precipitado y se resuspendió en buffer de lisis (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% Chaps, 100 mM DTT, 30 mM Tris-base e inhibidor de proteasas), finalmente se cuantificó la concentración de proteína con el kit 2D Quant.

1er dimensión de electroforesis (IEF)

Se hidrataron tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) en el dispositivo Ettan IPG box, con buffer de lisis, a su vez fueron cargadas con 1mg de proteína c/u, posteriormente se agregaron 2ml de aceite mineral por cada tira, las tiras se dejaron hidratando 12h [13].

Una vez hidratadas, las tiras fueron colocadas en el manifold con 108ml de aceite mineral. La separación en el Ettan IPGphor se realizó de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 1.

2da dimensión de electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida (12.5%) de 24cm², las tiras del IEF fueron tratadas con solución de equilibrio-DTT (50 mM Tris-HCl pH

Tabla 1: Perfil de voltaje para primera dimensión de electroforesis

Paso del perfil	Tipo de perfil	Voltaje (V)	Velocidad (V/h)
1	Fijo	500	500
2	Gradiente	1000	900
3	Gradiente	10000	19500
4	Fijo	10000	25000

8.8, 6 M Urea, 30% v/v Glicerol, 2% SDS, 0.5% DTT y trazas de azul de bromofenol, 13 min), y solución de equilibrio-iodoacetamida (en lugar de DDT, 4.5% Iodoacetamida, 13 min), se colocaron las tiras sobre los geles de poliacrilamida. Se estableció un perfil de corrida de 5 Watts 45min, y 180 Watts hasta que la línea de corrida alcanzara la base de los geles (4h aprox).

Tinción de geles

Se preparó solución de azul de coomassie 0.02%, esta solución se diluyó (1:10) en solución de etanol, ácido acético y agua desionizada (3:1:6), a la solución resultante se le agregó Cu₂SO₄ 0.1% (w/v). Se sumergieron completamente los geles en la solución de tinción y se dejaron tiñendo durante 96h aprox.

Una vez teñidos, se retiró el colorante en los geles con solución de ácido acético, etanol y agua desionizada (1:4:5).

Procesamiento de los geles

Las imágenes de los geles fueron digitalizadas con el ImageScanner III (GE Healthcare), y posteriormente fueron procesadas con el software ImageMaster 2D Platinum, en el cual se detectaron los spots correspondientes a las proteínas y se analizó la expresión de diferencias de proteínas en los 4 grupos de estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo el perfil electroforético de los 4 grupos de estudio (Imagen 1, pag.190), y el análisis de expresión diferencial arrojó 9 diferencias significativas, de las cuales 5 spots (167, 169, 174, 180, 181) solo se presentaron en el grupo EFI, por lo que se puede decir que la expresión de dicha proteína se debe al estímulo ocasionado por el tratamiento con extracto de fresa irradiada. Cuatro spots (34, 43, 99, 154) se identificaron solo en los grupos C, EF y EFI, por lo que se infirió estas 4 proteínas que se había expresado en las ratas control, no se expresan en el grupo de ratas obesas. Sin embargo, el tratamiento con extracto de fresa y extracto de fresa irradiada, incremento de manera favorable la expresión de dichas proteínas.

CONCLUSIONES

La obesidad modificó la expresión de proteínas en hígado de ratas y el extracto de fresa revirtió este cambio de expresión diferencial. Sin embargo, este efecto fue mejor con extracto de fresa irradiado. Además, el extracto de fresa irradiado incrementó la expresión de 5 proteínas no detectadas en los otros 3 grupos. En base a esto se pueden identificar las proteínas que presentaron cambios significativos mediante espectrometría de masas, para así poder profundizar más sobre la función que desempeñan estas proteínas y el extracto de la fresa irradiada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Azeneth Iglesias, Gabriela Ruiz, Gerardo Silva, Judith Ulloa y Ma. Eugenia Martínez de Korres, por su apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo de investigación, así mismo se agradece a la

Universidad de Guanajuato por su apoyo para que este proyecto fuera posible.

REFERENCIAS

- [1] Pérez-Vázquez, V., Guzmán-Flores, J. M., Mares-Álvarez, D., Hernández-Ortiz, M., Macías-Cervantes, M. H., Ramírez-Emiliano, J. & Encarnación-Guevara, S. (2014). Differential Proteomic Analysis of the Pancreas of Diabetic *db/db* Mice Reveals the Proteins Involved in the Development of Complications of Diabetes Mellitus. *Journal of Molecular Science*, 15(6), 9579-9593, doi: 10.3390/jms15069579.
- [2] Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761, doi: 10.1172/JCI200421625.
- [3] Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M. & Battino, M. (2014). Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3867-3876, doi: 10.1021/jf405455n.
- [4] Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B. & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition Journal*, 28(1), 9-19, doi: 10.1016/j.nut.2011.08.009.
- [5] Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T. Y., Gasparrini, M., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Quiles, J. L., Bompadre, S., Mezzetti, B. & Battino, M. (2014). Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality, *Molecules*, 19(6), 7798-7816, doi: 10.3390/molecules19067798.
- [6] Ayala-Gil, M. E. (2011), Efecto de la luz ultravioleta y la temperatura en la concentración de flavonoides del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa*), Tesis de maestría, Cinvestav-Irapuato.
- [7] Erkan, M., Wang, S. Y. & Wang, C. Y. (2008). Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 48(2), 163-171, doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.028.
- [8] González-Aguilar, G. A., Zavaleta-Gatica, R. & Tiznado-Hernández, M. E. (2007). Improving postharvest quality of mango "Haden" by UV-C treatment, *Postharvest Biotechnology and Technology*, 45(1), 108-116, doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.012.

[9] Allende, A., Marín, A., Buendía, B., Tomás-Barberán, F. & Gill, M. I. (2007). Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂, and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries, *Postharvest Biotechnology and Technology*, 46(3), 201-211, doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.05.007.

[10] Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A. A. (2009). UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 512-516, doi: 10.1016/j.ifset.2009.03.004.

[11] Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and

future, *Journal of Proteomics*, 73(11), 2064-2077, doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016.

[12] O'Farrell, P. H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021.

[13] Macías-Cervantes, M. H., Guzmán-Flores, J. M., Vargas-Ortiz, K., Díaz-Cisneros, F. J., Ramírez-Emiliano, J. & Pérez-Vázquez, V. (2014). Effect of Aerobic Exercise on Protein Expression in Muscle of Obese Mexican Adolescents: A Proteomic and Bioinformatic Analysis, *Natural Science*, 6(9), 641-650, doi:10.4236/ns.2014.69063.

IMAGEN 1: Comparativa de expresión proteica a partir de geles de electroforesis (○ = Proteínas que se expresaron en C, disminuyeron en O y volvieron a aumentar con el tratamiento, △ = Proteínas que solo se expresaron en las ratas tratadas con extracto de fresa irradiado).

