

Identificación de β -actina y del marcador de inflamación NF- κ B p65 en hígado, riñón y tejido adiposo de ratones con síndrome metabólico inducido, un estudio piloto.

Identification of β -actin and the inflammation marker NF κ B p65 in liver, kidney, and adipose tissue from mice with metabolic syndrome, a pilot study.

Caudillo-Gaona Miriam Yessenia¹, Caudillo-Gómez Karina Lizett¹, Vargas-Roa María Alondra¹, Murillo-Zavala Yareli Itzayana¹, Alonso-Castro Ángel Josabad², Barragan-Galvez Juan Carlos², Gonzalez-Rivera Maria Leonor.

¹División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

²Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

¹my.caudillogaona@ugto.mx, ¹kl.caudillogomez@ugto.mx, ¹ma.vargasroa@ugto.mx, ¹yi.murillozavala@ugto.mx, ²angeljosabad@ugto.mx, icbarragan@gmail.com, leonor.glez.rivera@outlook.com.

Resumen

Introducción. El factor de transcripción NF- κ B ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades metabólicas debido a su papel en la regulación de las respuestas inflamatorias. Se ha estudiado en relación con estas enfermedades y ha abierto nuevas perspectivas para enfoques terapéuticos en su tratamiento. Además, también se menciona el uso de plantas en la investigación para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento para estos trastornos metabólicos.

Amphipterygium adstringens, conocido popularmente como cuachalalate, palo de rosa, cuachalalá, maxiterán y volador, es un árbol endémico de México que se encuentra en varios estados de la república y ha despertado gran interés científico debido a las diversas propiedades farmacológicas que se le atribuyen, como ser anticancerígeno, antiinflamatorio, gastroprotector, antimicrobiano y cicatrizante.

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un método para la detección molecular por Western Blot de la subunidad p65 de NF κ B en tejido adiposo, riñón e hígado proveniente de ratones usados como modelo de síndrome metabólico.

Materiales y métodos. Los tejidos de hígado, riñón y tejido adiposo provenientes de ratones tratados con un extracto de *Amphipterygium adstringens* y una dieta rica en grasa durante 14 semanas, se sometieron a la homogenización (lisis) para extraer y cuantificar las proteínas. SDS-PAGE, electrotransferencia y Western Blot se usaron para la detección molecular por anticuerpos dirigido a p65 y β -actina.

Resultados. En este estudio, se obtuvieron con éxito y buen rendimiento y de forma íntegra las proteínas extraídas de los tejidos de hígado, riñón y tejido adiposo. Las muestras proteicas de tejidos fueron transferidas a membranas donde se detectó señal de la expresión de β -actina en los tres tejidos con las concentraciones de anticuerpos de 1:6000 y 1:1000. Mientras que la subunidad p65 fue únicamente detectada en tejido de hígado usando la concentración de anticuerpo a 1:500.

Conclusión. Mediante la extracción de proteínas de tejido adiposo, hígado y riñón, se estableció las condiciones iniciales de concentración de proteínas y anticuerpos para detectar β -actina, p65 y otros futuros marcadores.

Palabras clave: Síndrome metabólico; *Amphipterygium Astringens*; Western Blot; p65; β -actina; NF- κ B

Introducción

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas que son pauta de causar el desarrollo de una enfermedad cardiovascular, diabetes, aterosclerosis y otros problemas de salud graves [1]. La principal causa de un trastorno metabólico es el peso de las personas por el alto consumo de alimentos ricos en grasa y azúcar, provocando que las células adiposas que se acumulan aumentan las concentraciones de sustancias químicas denominadas ácidos grasos libres, que a su vez, aumentan las concentraciones de otras sustancias químicas y hormonas que causan un mal deterioro de concentración de azúcar en la sangre, ocasionando que el cuerpo no tolere la insulina (hormona encargada de la absorción de azúcar en el cuerpo) [2]. Ahora se reconoce ampliamente que la inflamación crónica de bajo grado juega un papel clave en el inicio, propagación y desarrollo de enfermedades metabólicas. De acuerdo con el papel central en la coordinación de las

respuestas inflamatorias, numerosos estudios recientes han implicado al factor de transcripción nuclear de la región *kappa* de las células B (NF- κ B) en el desarrollo de tales enfermedades, estableciendo la inflamación como un factor crítico en su etiología [3].

El NF- κ B desempeña un papel importante antes respuestas celulares a cambios ambientales. Es un regulador de expresión del gen de la cadena ligera *kappa* de los linfocitos B y modula la transcripción de varias citocinas y proteínas relacionadas a la inflamación y al estrés oxidativo que pueden ser activados por los ácidos grasos libres, hiperglicemia e hiperinsulinemia [5]. La forma activa del NF- κ B la constituye un heterodímero, que generalmente se compone de dos subunidades proteicas denominadas p65 y p50, estas se encuentran unidas por el inhibidor κ B (I κ B), impidiendo que se transloque al núcleo celular. Cuando la célula recibe una estimulación, ciertas quinasas específicas llevan a cabo la fosforilación del I κ B, lo que provoca una degradación de esta proteína mediante los proteosomas [5]. Como resultado, las proteínas p65 y p50 pueden ingresar al núcleo de la célula, donde se unen a secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes objetivos. Como parte de la vía de señalización de NF- κ B, la p65 suele estar involucrada en la respuesta inflamatoria del cuerpo [4].

En personas con obesidad, el tejido adiposo presenta una mayor infiltración de macrófagos en comparación con individuos de peso normal, que son atraídos por la liberación de citocinas proinflamatorias (adipocinas) [5]. También los adipocitos pueden producir factores de complemento, enzimas, factores de desarrollo y hormonas que contribuyen a un estrés oxidativo con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, lo que se ha vinculado con la resistencia a la insulina y al desarrollo diabetes mellitus. Por su parte, el NF- κ B también está involucrado en una amplia variedad de respuestas inflamatorias y apoptosis celular, por lo tanto, el estrés oxidativo generado por el síndrome metabólico contribuye a mantener el ambiente inflamatorio, activando casi todo el tiempo a NF- κ B, lo que estimula la expresión de genes que codifican proteínas y moléculas involucradas en los procesos inflamatorios [5-6].

En el caso del hígado, al aumentar el suministro de ácidos grasos libres al hígado (AGL), actúan como señales para activar el factor de transcripción PPAR- α (Receptores activados por proliferadores peroxisómicos), lo que conduce a un incremento en la oxidación de ácidos grasos en diferentes compartimentos celulares como la mitocondria, microsomas y peroxisomas. Durante este proceso, los productos de la oxidación de los AGL (como peróxido de hidrógeno, superóxido y peróxidos lipídicos) generan peroxidación lipídica y causan estrés biológico (tales como un exceso de lípidos, falta de oxígeno o niveles elevados de insulina), causando que el retículo endoplásmico desencadene una serie de efectos negativos en el organismo como la resistencia a la insulina, proceso de apoptosis mediado por la proteína caspasa 4, inflamación regulada por NF- κ B y alteraciones en el funcionamiento de las mitocondrias [5-6].

En el riñón, la activación de NF- κ B estimula la producción de diversas citocinas generadoras de inflamación como lo son la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otras. Las cuales promueven la migración de células inflamatorias como macrófagos y linfocitos hacia el tejido renal ocasionando una afección en las funciones renales de las células epiteliales del riñón que son esenciales para la reabsorción de nutrientes y la eliminación de productos de desecho lo que conlleva a la pérdida de función renal y aparición de enfermedades crónicas renales [7].

Por esta razón, NF- κ B se utilizó en este trabajo como marcador para identificar la actividad de inflamación presentes en algunos tejidos por medio de su expresión, y con ello poder evaluar posibles alteraciones de la regulación de inflamación por el efecto de nuevos tratamientos terapéuticos proveniente de plantas.

Amphipterygium adstringens (Schltdl.) es un árbol endémico que se encuentra en México, conocido popularmente por los nombres de cuachalalate, palo de rosa, cuachalalá, maxiterán y volador [8]. Este árbol se encuentra en el Pacífico, en los Estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. La altura de este árbol varía entre 6-10 cm, tiene un tallo curvo y sus hojas son gruesas. La capa más externa inicia con la periderma, una fina y lisa cubierta de color gris oscuro adornada con múltiples lenticelas, hablando sobre la corteza interna es de tonalidad rosada, que desprende una resina blanca y cremosa de aroma fuerte y agrio [9]. La parte que se utiliza del árbol es la corteza del tallo para tratar las diferentes enfermedades [9]. Dentro de los últimos años ha sido de interés científico por las diferentes propiedades farmacológicas que se le han atribuido como: anticancerígeno, antiinflamatorias, gastroprotectoras, antimicrobianas y cicatrizantes [10-11].

Actualmente no existen estudios que prueben que esta planta tenga un efecto sobre control del peso y que pueda alterar la expresión del marcador de inflamación p65-NF κ B con la cual se está siendo monitoreada. Por ello, el objetivo de este estudio fue estandarizar un método para la detección molecular por Western Blot de la subunidad p65 de NF- κ B en tejido adiposo, riñón e hígado proveniente de la cepa de ratones C57BL/6J, usados como modelo de síndrome metabólico.

Materiales y métodos

Animales: Se trabajó con ratones macho de la cepa C57BL/6J (cepa susceptible a desarrollar síndrome metabólico) alimentados con una dieta alta en grasas al 60% kCal (HFD: High-Fat Diet; research diets #D12492) para inducir obesidad y comorbilidades. Durante sus primeras 12 semanas de vida tuvieron una dieta normal (nutricubos y agua a voluntad) y las 14 semanas siguientes fueron alimentados con la dieta alta en grasas, hasta ser sacrificados a las 26 semanas de edad. En esas 14 semanas de la dieta rica en grasa, tres grupos de ratones fueron tratados con los extractos de cuachalalate con las dosis de 10, 50 y 100 mg/kg. El protocolo de este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de ética en la investigación del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (Proyecto 132.A).

Homogenización de tejidos: Los tejidos de hígado, riñón y tejido adiposo se extrajeron de ratones alimentados con dieta normal (DN), dieta rica en grasa (DG) sin tratamiento y administrados por vía oral con 10, 50 y 100 mg/kg del extracto de cuachalalate. Los tejidos se guardaron a -80°C para su uso posterior. Los tejidos obtenidos fueron descongelados y pesados para la adición de solución de lisis RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) que contiene: 25 mM de Tris pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% (v/v) de NP-40 y 0.5% (p/v) de Deoxicolato de sodio, suplementado con inhibidor de proteasas. Por cada 50 mg de tejido adiposo se adicionó 300 μl de solución de lisis; para 10 mg de tejido de hígado se le adicionó 10 μl de solución lisis y para 10 mg de tejido de riñón se adicionó 20 μl de solución de lisis. Los tejidos con solución se traspasaron a tubos con perlas de cerámica de circonio (3mm) para proceder con la homogenización (rompimiento celular) con 3 ciclos de 45 segundos/3700 rpm con descansos de 1 minuto en hielo para evitar el calentamiento. Los homogenizados se centrifugaron a 12500 rpm por 15 min y se obtuvo la fase del sobrenadante, descartando el pellet y la fase lipídica formada.

Cuantificación de proteínas por Bradford: Se prepararon diferentes concentraciones conocidas de proteína (0-1.5 mg/kg). La proteína utilizada del método para la preparación de la curva fue la albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras obtenidas de tejido se diluyeron 1:1 en PBS 1x a un volumen final de 10 μL . Todas las muestras se hicieron por duplicado y por cada 10 μl de muestra se agregó 190 μl del reactivo de ensayo Pierce™ Coomassie Plus (Bradford). Las lecturas de absorbancia se midieron por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm en el lector de microplacas Chromate. Se obtuvo una curva patrón de BSA y un coeficiente de determinación (R^2) para determinar las concentraciones de las muestras. El rendimiento de proteína total obtenida por cada mg de tejido se calculó multiplicando la concentración de la muestra ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) por el volumen de homogenizado obtenido (μl) entre el peso del tejido (mg) que fue homogenizado.

SDS-PAGE y electotransferencia: Se prepararon geles de poli(acrilamida) al 10% y se cargaron 20 μg de proteína en cada pozo (carril). Seguido se corrió la electroforesis a 110 V por 2 horas en condiciones desnaturizantes con SDS (dodecilsulfato sódico). Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas y presentes en el gel de poli(acrilamida) fueron transferidas por electroforesis (20V/1h) a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) con poro de 0.20 μm , utilizando el Módulo Mini Blot (ThermoFisher). Una vez terminada la electotransferencia, se tiñeron las proteínas de las membranas con rojo de Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas.

Western Blot: Las membranas transferidas, se bloquearon con la solución iBindFlex (Invitrogen) para luego proceder a la incubación con anticuerpos en el sistema de Western Blot iBind™ Flex Western Device (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del equipo. Se usaron anticuerpos para detectar β -Actina a concentraciones de 1:10000, 1:6000 y 1:1000; mientras que para detectar p65 se incubaron con los anticuerpos anti-p65 a concentraciones de 1:5000, 1:3000 y 1:500. Para el anticuerpo secundario anti-IgG se usó una dilución de 1:20000. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en la solución iBind™ Flex (Invitrogen). Se dejó incubar toda la noche y al día siguiente se retiraron las membranas y fueron lavadas en solución PBS 1x y posteriormente se adicionaron superficialmente los reactivos de luminol y peróxido (Sustrato para inmunotransferencia de ECL Pierce™) para revelar la membrana. La visualización se hizo en el equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (Biorad) con un tiempo de exposición de 10 minutos.

Remoción de anticuerpos y reusó de membranas: Para probar las diferentes concentraciones de anticuerpos sobre las mismas membranas, fueron sometidas por 20 minutos con una solución amortiguadora (1.5% (p/v) de glicina, 1% (p/v) de tween-20 a pH 2.6) que favorece el desprendimiento de los anticuerpos. Las membranas fueron lavadas tres veces por 10 minutos con solución PBS 1x a pH 7.5, y quedaron listas para ser reusadas y seguir el protocolo de Western Blot mencionado anteriormente.

Resultados

Obtención y cuantificación de proteínas de hígado, riñón y tejido adiposo.

Para extraer las proteínas requeridas para este estudio, como primer paso, se llevó a cabo el rompimiento de los tejidos de hígado, riñón y tejido adiposo. La lisis celular y la solubilización de proteínas son fundamentales para la identificación de marcadores moleculares. Después de la centrifugación del homogenizado, se observó una capa lipídica muy densa formada en la superficie en los tres tejidos, sobre todo en el tejido adiposo y de riñón (Figura 1a-c). También se observó un color rojizo obtenido en el hígado (figura 1a) y una fracción insoluble (pellet) al fondo del tubo en cada uno de los tejidos. Tanto la fase lipídica y el pellet se descartaron y solo se recuperó el sobrenadante para proceder a la cuantificación de proteínas.

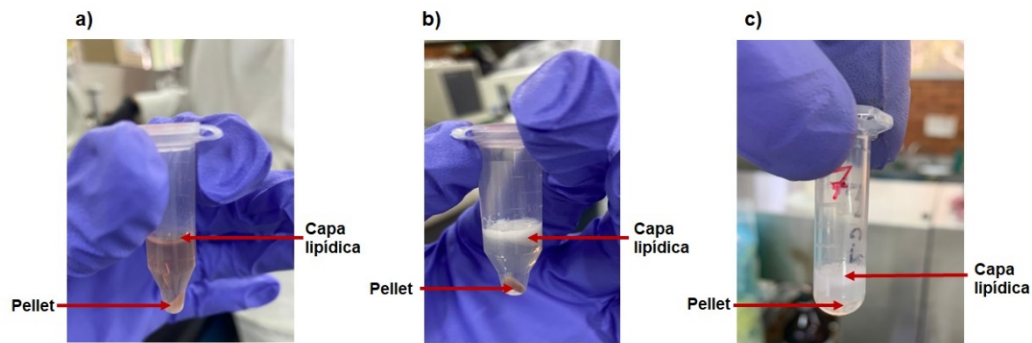


Figura 1. Extracciones obtenidas de la homogenización de a) hígado, b) riñón y c) tejido adiposo. Las flechas denotan las fases obtenidas después de la centrifugación del lisado del tejido.

Para determinar la concentración de proteínas totales de las muestras obtenidas de la homogenización, los resultados de absorbancia se interpolaron a una curva de calibración construida con albúmina sérica bovina (BSA) con concentraciones de 0-1.5 mg/ml obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) del 95%, lo cual nos permitió cuantificar con mejor exactitud la cantidad de proteína obtenida de los tejidos (figura 2). A partir de la curva BSA se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 1, donde se obtuvo una concentración desde 2.44 hasta 9.22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y con rendimientos obtenidos desde 15 hasta 99 μg de proteína por cada miligramo de tejido, donde se obtuvo mejor rendimiento principalmente el tejido de hígado y riñón.

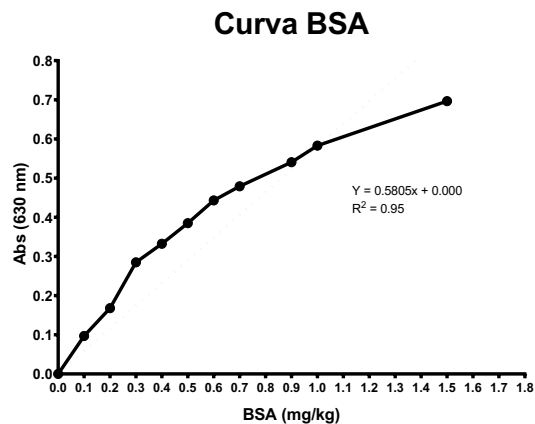


Figura 2. Curva estándar de BSA (Bovine Serum Albumin) con concentraciones de 0-1.5 mg/kg, para determinar la cantidad de proteínas presentes en las muestras de tejido adiposo, hígado y riñón. Las absorbancias fueron medidas a una longitud de onda de 630 nm. En la gráfica se muestra la ecuación y coeficiente de determinación (R^2) obtenida.

Tabla 1. Resultados obtenidos del rendimiento de proteínas totales obtenidas por la homogenización de los tejidos hígado, riñón y tejido adiposo.

Tratamiento	Peso del ratón* (g)	Tipo de tejido	Peso del tejido (mg)	Homogenizado obtenido (µl)	Concentración de proteína (µg/µl)	Rendimiento proteína (µg) /mg de tejido
DG+100 mg/kg	31	Riñón	29.4	600	2.44	49.80
DG+50 mg/kg	32	Riñón	33.3	600	3.70	66.67
DG+10 mg/kg	31	Riñón	32.1	600	5.18	96.82
DG	34	Riñón	31.1	600	2.34	45.14
DN	29	Riñón	36.0	600	5.96	99.33
DG+100 mg/kg	31	Hígado	75.6	700	4.40	40.74
DG+50 mg/kg	32	Hígado	80.5	700	8.10	70.43
DG+10 mg/kg	33	Hígado	84.0	700	7.85	65.42
DG	34	Hígado	73.0	700	7.99	76.62
DN	26	Hígado	71.8	700	9.27	90.38
DG+100 mg/kg	31	Tejido adiposo	76.5	359	3.46	16.24
DG+50 mg/kg	32	Tejido adiposo	47.6	186	5.18	20.24
DG+10 mg/kg	31	Tejido adiposo	224.9	1149	5.56	28.41
DG	34	Tejido adiposo	178.70	872	3.11	15.18
DN	29	Tejido adiposo	126.1	657	6.64	34.60

DG, Dieta rica en grasa; DN, Dieta normal; * peso de los ratones antes de ser sacrificado.

Detección de β -actina y p65 en hígado, riñón y tejido adiposo.

Las muestras provenientes de la homogenización de tejidos se sometieron a electroforesis de SDS-PAGE. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron por electrotransferencia a membranas absorbentes de PVDF y teñidas con rojo de Ponceau, como se muestra en la figura 3 a, b y c (panel superior), donde en el carril 1 se muestra el marcador de Peso molecular (PM), carril 2 muestra la electroforesis del extracto proteico de los tejidos provenientes de los ratones que solamente se sometieron a una dieta normal (DN), carril 3 corresponde al extracto de tejido de ratones que llevaron una dieta rica en grasa (DG), mientras que en carril 4, 5 y 6 corresponden a la separación de proteínas provenientes de ratones que también llevaron una dieta rica en grasa y además tratados con las dosis 10, 50 y 100 mg/kg de cuachalalate. Las membranas teñidas con rojo de Ponceau demostraron que las extracciones proteicas de los tejidos están integras y no presentan degradación.

Las membranas reveladas mostraron señal como resultado de la incubación con los anticuerpos. Como se muestra en la figura 3a (paneles inferiores), a una concentración de 1:6000 de anticuerpo para β -actina, se detectó una señal en la membrana con las muestras provenientes de hígado con un peso molecular aproximado de 43 kDa que corresponde a β -actina, pero solo se logró visualizar en los carriles DN y DG, mientras que a una concentración de 1:1000 se logró detectar señal en todos los carriles. Cabe mencionar que usando la concentración 1:10000 del anticuerpo contra β -actina, no se logró visualizar señal en el revelado. Para el caso de la detección de p65 (subunidad de NF- κ B no fosforilado), usando la concentración de anticuerpo a 1:500, se logró observar una señal a ~70 kDa que corresponde al peso molecular esperado de p65 (figura 3a, panel inferior de p65). Caso contrario, ni una señal fue visualizada usando concentraciones de anticuerpo de 1:5000 y 1:3000.

Para el revelado de la membrana con proteínas provenientes del riñón mostrados en la figura 3b (paneles inferiores), se logró visualizar una señal a ~43 kDa con las concentraciones de anticuerpo para β -actina de 1:6000 y 1:1000. Ni una señal fue detectada a concentración de 1:10000. En el caso de la detección de p65

de NF- κ B, tampoco se pudo detectar señal en el revelado a concentraciones de anticuerpo de 1:6000, 1:3000 y 1:500.

La membrana con las proteínas de tejido adiposo mostrada en la figura 3c (parte inferior) tuvo resultados similares al western blot de riñón, donde solo se visualizó señal con un peso de ~43 kDa en todos los carriles, a concentraciones de anticuerpo para β -actina de 1:6000 y 1:1000. Caso contrario con la concentración anticuerpo de 1:10000 no se visualizó señal en el revelado. Para la a detección de p65 de NF- κ B tampoco se obtuvo éxito en la detección usando concentraciones de anticuerpos 1:6000, 1:3000 y 1:500.

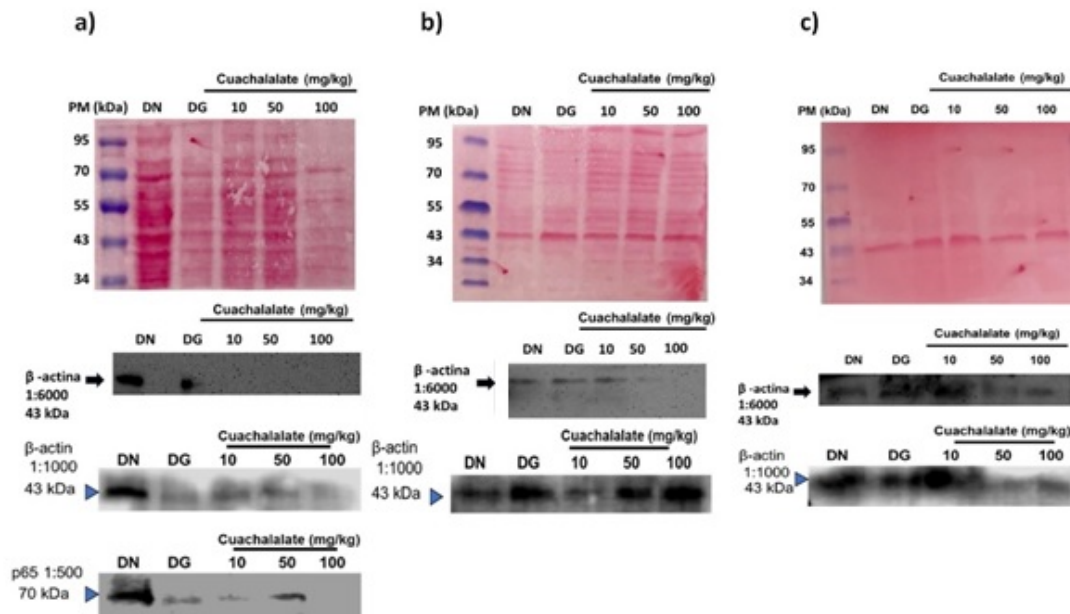


Figura 3. Resultados obtenidos de la electrotransferencia y Western Blot. En los incisos a, b y c se observan las muestras cargadas proveniente de hígado, riñón y tejido adiposo, respectivamente. En la parte superior se muestra la membrana con las proteínas transferidas y teñidas con rojo de Ponceau de cada uno de los tejidos. Las muestras provienen de ratones acorde a la dieta que siguieron: DN, dieta normal; DG, dieta rica en grasa y que además fueron tratadas con las tres dosis empleadas de cuachalalate (10, 50 y 100 mg/kg). En la parte inferior se muestra el revelado de las membranas por Western Blot y se denotan los anticuerpos y las concentraciones usadas.

Discusión

El primer paso para poder cuantificar las proteínas extraídas de las células es el rompimiento celular, el cual se puede realizar por medio de un método mecánico (homogenización, sonicación, ciclos de congelado-descongelado y uso de presiones altas). Durante el rompimiento de la membrana celular, es fundamental que la solución de lisis sea suplementada con compuestos químicos que pueda inhibir a las enzimas proteasas, esto para poder mantener la integridad de las proteínas y evitar una degradación total de ellas, obteniendo así una solución con extractos proteicos y diferentes compuestos químicos (metabolitos, biomoléculas, fragmentos celulares, entre otros) [12].

Durante la realización de este trabajo, se utilizó el homogeneizador automático usando perlas de circonio para triturar el tejido, sometiéndolo a altas presiones con la finalidad de llevar a cabo el rompimiento celular, cuidando evitar dañar los componentes celulares por la generación de calor provocado por la fuerza mecánica, que con éxito se pudo extraer proteínas de manera íntegra [12].

El siguiente paso fue la cuantificación de proteínas de estos tejidos homogenizados por el método de Bradford, que como principio, detecta por interacción los grupos amino y carboxilo presentes en los

aminoácidos, ya que se unen dichas proteínas a un colorante azul denominado *Coomassie Brilliant Blue G-250*, ocasionando un cambio de coloración que puede ser cuantificado por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, permitiendo así determinar la concentración de proteínas en la muestra. El uso de este método fue tomando en cuenta su sensibilidad, facilidad de uso y rapidez, lo que lo convirtió en una herramienta eficiente para calcular la cantidad de proteína extraída y su rendimiento obtenido de las muestras tanto de hígado, riñón y tejido adiposo [13].

Una vez que se obtuvo el sobrenadante del homogenizado de las muestras y conocida su concentración, se realizó la separación de proteínas en función de su masa molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), que les confiere una carga negativa neta a las proteínas, separándose y volviéndose proteínas más lineales por la desnaturalización. La velocidad y la resolución de la separación de las proteínas unidas al SDS a través del gel depende principalmente de su tamaño, permitiendo estimar el peso molecular al compararlo con marcadores de pesos moleculares conocidas [15]. Las moléculas más pequeñas se moverán más rápidamente y las más grandes quedarán cerca del lugar de partido en el gel [16].

Durante el proceso de homogenización y cuantificación de proteínas, se obtuvo con éxito la obtención de los extractos proteicos con buenos rendimientos (de 16 hasta 99 μg por cada mg de tejido) de cada uno de los tejidos, donde notablemente se observó en cada uno de los extractos una formación de capa lipídica que hace coherencia al exceso de grasa que consumieron en sus dietas los ratones durante 14 semanas.

Para continuar con la detección específica de β -actina y p65 a partir de las muestras de tejido, se llevó a cabo la inmunotransferencia de proteínas o mejor conocida como Western Blot. Esta técnica se basa en la separación de proteínas acorde a su carga y el peso molecular en geles de poliacrilamida como fue mencionado anteriormente, así como la transferencia a una membrana sólida en la cual un anticuerpo identificara la proteína de interés. Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, los reportes indican que, en situaciones de inflamación provocadas por obesidad, la expresión del p65 se ve aumentada, y por ese motivo, se decidió estandarizar la detección molecular de p65, y como control de carga β -actina por la técnica Western Blot, con el uso anticuerpos específicos, que nos proporcionó información relevante sobre la presencia de estos marcadores en los tejidos evaluados en este trabajo, así como las condiciones metodológicas para poder detectar en futuro otros marcados en estos tejidos provenientes de ratones con síndrome metabólico inducido [17].

Debido a que β -actina es una proteína de expresión constitutiva y abundante en las células y tejidos, se usó como control de carga en este estudio [19]. β -actina fue detectada fácilmente en los tres tejidos evaluados (hígado, riñón y tejido adiposo), a concentraciones de anticuerpos usados de 1:6000 y 1:1000, mejorando su visualización con la concentración de 1:1000. Sin embargo, para p65 solo fue detectado en tejido de hígado, y no en los tejidos de riñón y adiposo. Esto puede deberse a que los niveles de expresión p65 en estos tejidos sean menores que en hígado, por lo tanto, se sugiere aumentar la cantidad de proteína y anticuerpo para lograr detectar p65 en estos tejidos.

Cabe mencionar que, en las membranas teñidas con rojo, pareciera a simple vista que no hay diferencias en las cantidades de proteínas cargadas y transferidas, sin embargo, durante el Western Blot se pudo detectar variaciones de señales (unas bandas más intensas que otras). Las variaciones de intensidad de señal vistas en los carriles del western blot para p65 (en hígado) y principalmente para β -actina, no se debe a diferencias de niveles de expresión causadas por los tratamientos como se esperaba, si no que las diferencias pudieron haber sido por errores en las lecturas reales de absorbancias durante cuantificación de proteínas, debido a que la solución de lisis RIPA contiene Tris y detergentes como NP-40 que reaccionan con el reactivo Bradford y cambian de color por si solos, causando fondo en la lectura de absorbancia real y por lo tanto alterando la cantidad que realmente fue cargada en los geles de poliacrilamida, esto quiere decir que se pudo haber cargado más o menos cantidad de proteína que la cantidad de 20 μg teóricos calculados con la curva de BSA [18]. Se sugiere que, en futuro, la homogenización de muestras sea con una solución que no interfiera con el método de Bradford o cambiar el método de cuantificación de proteínas por otro que no interfiera con los componentes de la solución de lisis, como es el método de BCA (ácido bicinonínico)

Este estudio piloto, nos permitió establecer las primeras condiciones extracción proteica durante la homogenización (lisis), la cuantificación y las concentraciones de anticuerpos para el western blot. Las tinciones con rojo de Ponceau y la detección de β -actina, demostraron que las extracciones proteicas fueron integrales y no presentaron degradación en las muestras. Sin embargo, es importante resolver el problema de la cuantificación de proteínas por el fondo de lectura de absorbancias causados por la solución de lisis que altera las cantidades reales de proteínas. También se sugiere seguir probando relaciones estequiométricas

de cantidad de proteína y concentración de anticuerpos para lograr identificar a p65 y otros marcadores de interés por western blot.

Conclusión

En este trabajo se pudo con éxito extraer proteína de tejido adiposo, hígado y riñón, y además se establecieron las condiciones preliminares de concentración de proteínas y anticuerpos para la detección de β -actina y p65. Se sugiere que, en futuros experimentos, se siga estandarizando el método de cuantificación de proteínas, la cantidad de proteína y anticuerpo para mejorar la detección de p65 y otros marcadores de inflamación involucrados en el síndrome metabólico.

Referencias

- [1]. Carlos, J., & Robles, L. (2013). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *Anales de La Facultad de Medicina*, 74(4), 315–320. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [2]. *Síndrome metabólico - Causas y factores de riesgo | NHLBI, NIH*. (n.d.). Retrieved July 21, 2023, from <https://www.nlm.nih.gov/es/salud/sindrome-metabolico/causas>
- [3]. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):11-22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008. PMID: 21195345; PMCID: PMC3040418.
- [4]. David Bruce, PhD. p65 and the NF- κ B inflammatory pathway. *Abcam* <https://www.abcam.com/cancer/p65-and-the-nf-b-inflammatory-pathway> Accessed: 2023-07-20
- [5]. Edgar Acosta García. (2012). Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 2, 94–183.
- [6]. *Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica: Conceptos Actuales*. (n.d.). Retrieved July 21, 2023, from https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422011000300005
- [7]. Song, N., Thaiss, F., & Guo, L. (2019). NF κ B and Kidney Injury. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 815. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00815>. Goicoechea Diezandino M. Obesidad y Progresión de la Enfermedad Renal. En: Lorenzo V., López Gómez JM (Eds). *Nefrología al día*. ISSN: 2659-2606. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/210>, Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J. C., López-Roa, R. I., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 67(2), 88–97. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462010000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [8]. Beltrán-Rodríguez, L.; Cristians, S.; Sierra-Huelsz, A.; Blancas, J.; Maldonado-Almanza, B.; Bye, R. *Las cortezas como productos forestales no maderables en México: análisis nacional y recomendaciones para su uso sustentable*; Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): Ciudad de México, México, 2020.
- [9]. Guzmán-Pozos, A. M., & Cruz-Cruz, E. (2014). Características físicas de frutos de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl) de tres procedencias. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3), 255–260. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [10]. Alcocer, G. Las julianiaceas. *Anal Mus. Nal.* 1907, 11, 318–327.
- [11]. Sotelo-Barrera, M., Cilia-García, M., Luna-Cavazos, M., Díaz-Núñez, J. L., Romero-Manzanares, A., Soto-Hernández, R. M., & Castillo-Juárez, I. (2022). *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl (Anacardiaceae): An Endemic Plant with Relevant Pharmacological Properties. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 1766, 11(13), 1766. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11131766>
- [12]. Andrade, G., Alcántara, H., González, M., Silva, R., & Vilchis Landeros, L. (2021). *Comité Editorial: Purificación de proteínas*. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

- [13]. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [14]. María de Lourdes Pérez-Chabela, Jorge Soriano-Santos, Edith Ponce-Alquicira, Lourdes Mariana Díaz-Tenorio. Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. *NACAMEH Vol. 9, No. 2*, pp. 77-96, 2015
- [15]. Gel electrophoresis. Sigmaaldrich.com. Retrieved July 20, 2023, from <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/protein-biology/gel-electrophoresis>
- [16]. Método: Gel de poliacrilamida para proteínas. (2017, junio 26). Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>
- [17]. Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>, Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- [18]. Zanini, L., Zaltron, A., Turato, E., Zamboni, R., & Sada, C. (2022). Opto-Microfluidic Integration of the Bradford Protein Assay in Lithium Niobate Lab-on-a-Chip. *Sensors 2022, Vol. 22, Page 1144*, 22(3), 1144. <https://doi.org/10.3390/S22031144>
- [19]. Medina-Urrutia, A., Posadas-Romero, C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Villarreal-Molina, T., González-Salazar, M. del C., Cardoso-Saldaña, G., Vargas-Alarcón, G., Torres-Tamayo, M., & Juárez-Rojas, J. G. (2015). Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12933-015-0184-5>