

## TRABAJO FINAL DE MASTER

### Manejo de la técnica Western Blot.

### Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes.



**Autor:** Iñaki Milton Laskibar

**Tutor:** Leixuri Aguirre



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Western Blot</b> .....	<b>1</b>
<b>PPAR´s</b> .....	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>Reactivos</b> .....	<b>9</b>
<b>Animales, tratamiento y diseño experimental</b> .....	<b>10</b>
<b>Extracción de tejido</b> .....	<b>11</b>
<b>Determinación del contenido proteico mediante método de Bradford</b> .....	<b>11</b>
<b>Modificaciones realizadas en el protocolo de WB para la puesta a punto</b> .....	<b>12</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>16</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>23</b>



## INTRODUCCIÓN

### Western Blot

El Western Blot (WB), también conocido como "protein blotting" o "inmunoblotting", es una técnica introducida por Towbin *et al.* en 1979 (1) que sirve para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogenados celulares complejos. En estas tres décadas, la sensibilidad y fiabilidad de la técnica han ido mejorando, siendo hoy en día una técnica de uso común en laboratorios de investigación (2).

Esta técnica permite transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS) a una membrana absorbente, siendo las proteínas transferidas a la membrana una copia exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis. Esta transferencia de gel a membrana supone una gran herramienta para la detección y caracterización de proteínas, especialmente las que están en bajas abundancias (3).

Esta membrana es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añade un fluoróforo (peroxidasa de rábano), el cual emitirá una luz que nosotros vemos en forma de bandas (las cuales corresponden a las proteínas) (4).

Las ventajas específicas que supone la técnica de WB son las siguientes:

- Las membranas húmedas son flexibles y fáciles de manipular.
- Las proteínas bloqueadas en la membrana son accesibles para los diferentes ligandos.
- Se necesitan pocos reactivos para el análisis.
- Se pueden mantener las membranas útiles durante más tiempo.

A estas ventajas hay que sumarle la evolución constante que tiene el "protein blotting" desde sus inicios, lo que nos permite hoy en día trabajar con diferentes medios y modos de transferencia de proteínas (3).

En las siguientes líneas se explican brevemente los diferentes procesos que componen la técnica de WB. Estos procesos serán citados en el apartado de material y métodos, donde se explicará los cambios realizados al "proceso general" para la puesta a punto del WB para el PPAR  $\gamma$ .

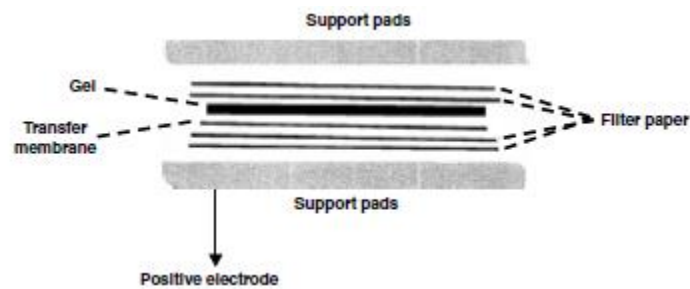
### Electroforesis

El objetivo de la electroforesis es la de separar las proteínas de la muestra en base a su peso molecular. Para ello, la estrategia más común es usar Tris-glicina SDS-PAGE. Las proteínas de la muestra (previamente desnaturalizadas por calor) se unen con el SDS, creando complejos negativamente cargados; la cantidad de SDS que se une a las proteínas

desnaturalizadas es proporcional al peso molecular de estas. Esto hace que una vez que aplicamos la corriente, los complejos SDS-proteína (cargados negativamente) migren por el gel de poliacrilamida en base al tamaño del polipéptido (5).

### Electrotransferencia

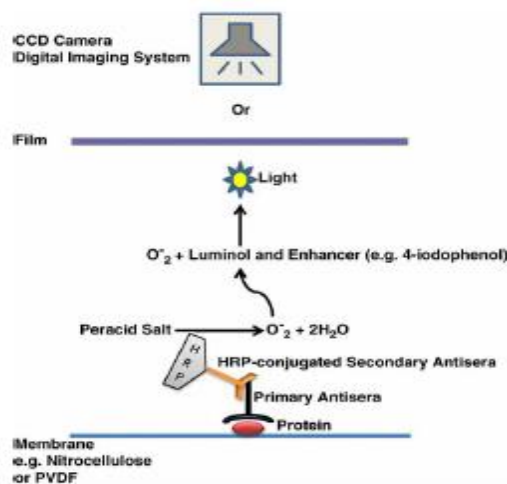
Es la técnica más utilizada para transferir proteínas de un gel a una membrana de PVDF, una vez que la electroforesis ha finalizado. La velocidad y eficacia de esta técnica supone una gran ventaja respecto a la transferencia por difusión o la transferencia al vacío (3).



**Figura 1.** Montaje del sándwich para transferencia de gel a membrana (3).

### Hibridación

El proceso se basa en hibridar la proteína diana (que se ha transferido del gel a la membrana de PVDF) con un anticuerpo primario, el cual luego se hibrida con un anticuerpo secundario marcado con una enzima (peroxidasa de rábano). Esta enzima, en presencia de luminol, emite una luz que se recoge en un film fotosensible, y será esta señal la que represente a la proteína diana.



**Figura 2.** Proceso de cuantificación de proteína de la membrana (5).

A pesar de los avances y nuevas tecnologías, el uso de los anticuerpos es una parte crítica en el WB, porque determinará la sensibilidad de la prueba.

Es por ello que la utilización de una dilución óptima de los anticuerpos (tanto primario como secundario) es esencial para que el resultado sea el deseado (5).

### Revelado

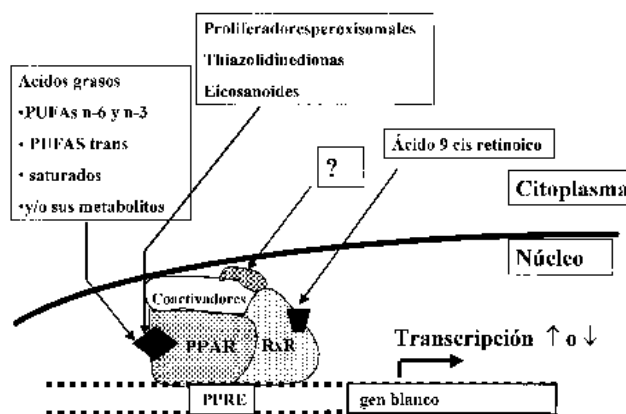
En este proceso, la peroxidasa de rábano unida al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno. Como resultado de esta reacción, el luminol se descompone emitiendo una señal luminosa, la cual es recogida por el aparato de medición y nos permitirá cuantificar la proteína de la muestra (6).

### Stripping

Esta técnica se basa en "borrar" el WB para volverlo a hibridar, y fue propuesta por Kaufmann *et al.* en 1987 (7). Hoy en día existen en el mercado diferentes tampones para el stripping, pero todos ellos hacen lo mismo; retirar los anticuerpos de la membrana manteniendo las proteínas de estudio adheridas a ella y en condiciones de ser incubadas con nuevos anticuerpos (5).

### **PPAR's**

Los receptores activadores de proliferación de peroxisomas (PPAR's), pertenecen a la súper-familia de receptores nucleares de factores de transcripción inducibles por ligandos. En mamíferos hay tres tipos; PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Cuando unen ligandos nucleares, forman heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR) y controlan la expresión de genes relacionados con la adipogénesis, metabolismo lipídico, inflamación y mantenimiento de la homeostasis metabólica.

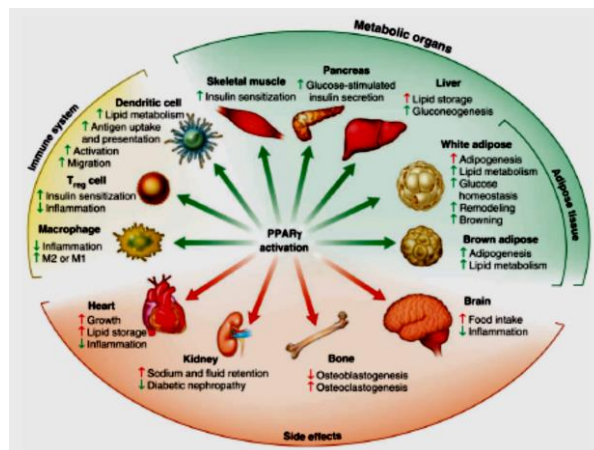


**Figura 3.** Mecanismo básico de acción de PPAR (8).

Como sucede con otros receptores nucleares, los PPARs están compuestos por diferentes dominios funcionales (dominio de transactivación de N-terminal AF1, dominio de unión de DNA DBD, dominio de unión de ligandos

de C-terminal LBD) los cuales son dianas potenciales para la modulación de cascadas señalizadas por los propios PPARs (9).

Además de ser receptores de grasas comunes en la dieta (como el ácido oleico, linoleico y linolénico), los PPARs también unen y responden a diversos metabolitos lipídicos, incluyendo la prostaglandina J2, el ácido 8S-hidroxi-eicosatetraenoico y diferentes fosfolípidos oxidados. Cuando la unión del ligando se produce, esto induce un cambio en la conformación del receptor, permitiendo el reclutamiento de cofactores que a su vez modularán la actividad del PPAR (9).



**Figura 4.** Efectos beneficiosos (flechas verdes) y adversos (flechas rojas) conocidos de la activación del PPAR $\gamma$  (9).

PPAR $\gamma$ : Sobre todo se expresa en el tejido adiposo blanco y marrón, en donde es el principal regulador de la adipogénesis, así como un potente regulador del metabolismo de los lípidos de todo el cuerpo y la sensibilidad a la insulina. Existen dos isoformas de este PPAR, el  $\gamma$ 1 y el  $\gamma$ 2 (este último con 30 amino ácidos más en su extremo N terminal); el PPAR $\gamma$ 1 se expresa en varios tejidos, mientras que la expresión del PPAR $\gamma$ 2 está restringida al tejido adiposo en condiciones fisiológicas (aunque puede ser inducido en otros tejidos por una dieta rica en grasa).

Aparte de la adipogénesis, el PPAR $\gamma$  también regula la expresión de varias proteínas responsables de la acumulación de lípidos (triglicéridos, TG) en los adipocitos, como la proteína ligante de ácidos grasos aP2, la proteína que transporta ácidos grasos (FATP), la acil-CoA sintetasa (ACS), la lipoproteína lipasa (LPL) y la enzima málica (ME) (8).

Aunque se ha visto que los ácidos grasos tienen capacidad para unirse y activar el PPAR $\gamma$ , los investigadores están teniendo dificultades para encontrar ligandos endógenos específicos. Además, la influencia específica tanto de los ácidos grasos como de sus metabolitos, todavía no está clara.



Dado el papel que tiene el PPAR $\gamma$  en la diferenciación y función de los adipocitos, se baraja su participación en el desarrollo de la obesidad. Esta hipótesis se basa en los siguientes hechos:

- Las tiazolidinedionas (fármacos antidiabéticos activadores de PPAR) reducen la expresión del gen *ob/ob* productor de leptina, lo que estimula la ingesta de alimentos en ratas.
- Los seres humanos obesos presentan niveles elevados de mRNA de PPAR $\gamma$ 2 en el tejido adiposo. Además, se ha determinado que el índice de masa corporal (IMC) es directamente proporcional al ratio PPAR $\gamma$ 2/ PPAR $\gamma$ 1, y que se reduce con la bajada en la ingesta calórica.
- Los individuos portadores de la mutación Pro<sub>115</sub>Gln en el PPAR $\gamma$ 2 tienen un IMC alto en relación con los obesos sin esta mutación (47.3 y 37.9 respectivamente). Se ha visto que la expresión de esta mutación en los fibroblastos induce su diferenciación a adipocitos y acumulación de TG. Cabe destacar que la mutación Pro<sub>115</sub>Gln contrarresta el efecto antiadipogénico que tiene la fosforilación del PPAR $\gamma$ 2 (impidiendo la fosforilación de la Ser<sub>114</sub>).
- La activación transitoria de PPAR $\gamma$  *in vivo* induce la expresión de las tres isoformas de UCP en grasa parda, mientras que su activación crónica confiere a la grasa parda características de tejido adiposo blanco.

Como se puede observar, existen datos suficientes para considerar al PPAR $\gamma$  como uno de los agentes a tener en cuenta en el estudio de la obesidad (8).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo fin de máster, es poner a punto la técnica WB para la detección de PPAR $\gamma$ .

Para conseguir este objetivo, se ha utilizado el protocolo para WB que se emplea en el laboratorio de nutrición, el cual se ha ido modificando para adecuarlo a la cuantificación de PPAR $\gamma$ .

Una vez que se ha puesto a punto la técnica, se ha realizado la cuantificación de PPAR $\gamma$  en muestras de dos estudios diferentes realizados en ratas; uno con ratas Zucker *fa/fa* (obesidad genética) y el otro con ratas Wistar a las que se les ha dado una dieta "high fat and high sucrose" (HFHS).

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, la bibliografía indica que en situaciones de obesidad/ganancia de peso la expresión del PPAR $\gamma$  se ve aumentada.

La puesta a punto del WB para PPAR $\gamma$  nos permitirá poder cuantificar la expresión de esta proteína en las diferentes muestras con las que vamos a trabajar, y por otro lado comprobar si en los individuos más obesos (o que hayan ganado más peso) la expresión de esta proteína se ve aumentada.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos

#### Bradford

Reactivos	Cantidad
Azul brillante Coomassie G-250	100 mg
Etanol 96%	50 mL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (al 85%)	100 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 1 L

#### WB

PBS CELULAR	
Reactivo	Cantidad
NaCl 0,15M	8,76 g
KCl 3 mM	0,223 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3Mm	0,36 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,5 mM	1,06 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 1 L

(Comprobar pH=7,4)

Gel separador (7.5% acrilamida)		Gel concentrador	
Reactivo	Cantidad (1 gel)	Reactivo	Cantidad (1 gel)
Proteogel	1,25 mL	Proteogel	0,417 mL
Tampón proteogel	1,3 mL	Stacking buffer	0,625 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	2,395 mL	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1,525 mL
Persulfato amónico (al 10%)	50 µL	Persulfato amónico (al 10%)	25 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6,25 µL

Tampón de carga		Persulfato amónico (al 10%)	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
B Mercaptoethanol	50 µL	Persulfato amónico	10 mg
Laemmli Sample buffer	950 µL	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	100 µL

Stock electroforesis buffer		Electroforesis buffer	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Tris glicina	15,14 g	Stock buffer	140 mL
Glicina	72,05 g	SDS al 10%	7 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 700 mL

(Comprobar pH=8,3)

Stock buffer transferencia		Buffer transferencia	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Tris base	58 g	Stock transferencia	100 mL
Glicina	29,2 g	Metanol	200 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 1 L	SDS	10 mL
		H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 1 L

(Comprobar pH=9,2)

PBS Tween	
Reactivo	Cantidad
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,36 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,95 g
NaCl	0,584 g
Tween 20	2 ml

(Comprobar ph=7,4 ó 7,46)

<b>Tampón de bloqueo</b>	
<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Bovine Serum Albumine	0,125 g
Caseina	1,250 g
PBS Tween	25 mL

<b>Ac primario (1:1000)</b>		<b>Ac secundario (1:5000)</b>	
<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Azida sódica (0,1 %)	0,01 g	BSA (0,1%)	0,01 g
Bovine Serum Albumine (BSA) (0,1%)	0,01 g	Ac secundario	2 µL
Ac primario	10 µL	PBS Tween	10 mL
PBS Tween	10 mL		

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Luminol	500 µL
ECL substrate	500 µL

<b>Hard stripping buffer</b>		<b>Mild stripping buffer</b>	
<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
SDS al 10%	5 mL	SDS	0,25 mL
Tris HCl (0,5m)	3,125 mL	Glicina	3,75 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	16,875 mL	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Hasta 250 mL
β Mercaptoetanol	0,2 mL	Tween 20	2,5 mL

(Comprobar pH=2,2)

### **Animales, tratamiento y diseño experimental**

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, una vez que se ha puesto a punto el WB para PPAR $\gamma$ , se ha realizado la cuantificación de esta proteína en muestras de dos estudios con ratas.

#### Rata Zucker (fa/fa)

Para realizar este experimento, se utilizaron 20 ratas Zucker macho de 5 semanas de edad, y un peso aproximado de 200 g, suministrados por Laboratorios Charles River (Barcelona). Los animales fueron estabulados en el Instituto de investigación Biodonostia, en jaulas metabólicas individuales, a temperatura estable y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Tras pasar un periodo de adaptación de 6 días, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales de 10 animales cada uno: grupo control (CO) y el grupo tratado con rosuvastatina (ROSU). A los animales del grupo tratado, se les administró una dosis de estatina de 0,6 mg/kg de peso corporal/día disuelta en 1 mL de suero salino mediante gavage oral. De esta manera nos aseguramos que todas las ratas tomaron el medicamento y que la dosis fue la misma para todas. A lo largo de todo el periodo experimental (6 semanas), los animales tuvieron acceso libre a la comida (dieta estándar tipo "chow") y al agua, siendo registrados diariamente tanto la ingesta como el peso corporal de cada animal.

### Ratas Wistar

Este experimento se realizó con 16 ratas Wistar macho de 5 semanas de edad, y un peso aproximado de 132 g. Los animales fueron estabulados en jaulas metabólicas individuales, a temperatura estable y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Tras pasar un periodo de adaptación de 6 días, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales de 8 animales cada uno: grupo control (CO) y el grupo tratado con resveratrol (RSV) 30 mg/kg peso/día. A lo largo de todo el periodo experimental (6 semanas), a ambos grupos se les suministró una dieta HFHS.

### **Extracción de tejido**

Una vez finalizado el periodo experimental, se sacrificó a los animales en los dos experimentos mediante exsanguinación cardiaca. La única diferencia de metodología fue el tipo de anestesia que se empleó:

- Con las ratas Zucker se utilizó el isofluorano.
- Con las ratas Wistar se utilizó el hidrato de cloral.

Tras sacrificar a los animales, se diseccionaron y se pesaron los tejidos adiposos blancos (epididimal, perirenal, mesentérico y subcutáneo) y los hígados. Estos tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno (N<sub>2</sub>) líquido, y se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

### Homogeneización de tejidos

Se toman aproximadamente 100 mg de tejido adiposo que se deposita en el homogeneizador de Potter, junto con 5 veces el peso de la muestra en volumen de tampón (500 µl de PBS celular + 0.5 µl de iodoacetamida y 5 µl de PMSF). La mezcla es homogeneizada en frío, para después pasarlo a un eppendorf, el cual se centrifuga a 800 g durante 5 minutos (a 4°C). Una vez se ha centrifugado la muestra, se recoge el sobrenadante y se determina su contenido proteico (en este caso mediante la técnica de Bradford). Este homogeneizado se procesa o se conserva a -80°C (se puede conservar a -20°C si se van a procesar las muestras en un periodo corto de tiempo).

### **Determinación del contenido proteico mediante método de Bradford**

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra se empleó la técnica de Bradford. Esta técnica espectrofotométrica se basa en la unión no covalente de las proteínas con el azul *Coomassie*, creando un complejo de color azul que tiene un elevado coeficiente de extinción a 596-620 nm. Dependiendo de la concentración de proteínas de las muestras, el color cambiará de un color pardo a un azulado, haciendo posible la cuantificación del contenido proteico mediante colorimetría (10).

Reactivos utilizados:

Patrón de proteínas: 1 mg/ml de (BSA).

Reactivo de Bradford: Se preparó disolviendo 100 mg de azul brillante de *Coomassie* G-250 en 50 mL de etanol al 96%. Se añadieron 600 mL de agua destilada y 100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%. Se enrasó con agua a 1 litro y se almacenó hasta su uso en un frasco topacio a temperatura de refrigeración.

*Procedimiento:*

- En una microplaca se prepara la recta patrón pipeteando por duplicado en la primera fila de la placa 0, 2,5, 5, 7,5, y 10 µL de patrón.
- En los pocillos correspondientes a cada muestra, se pipetea 5 µL (por duplicado).
- Se añaden a todos los pocillos (tanto recta patrón como muestras) 250 µL de reactivo de Bradford previamente preparado.

Una vez cargada la placa se introduce en el lector, donde se agita durante 10 segundos (para eliminar las posibles burbujas de pipeteo) y se incuba 2 minutos a temperatura ambiente para después medir la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

El lector nos dará los resultados en mg/mL, y con ellos se hace la curva y la ecuación con la cual se calcula el contenido en proteínas de cada muestra.

### **Modificaciones realizadas en el protocolo de WB para la puesta a punto**

#### Electroforesis

Para poner a punto la técnica, se hizo un pool con diferentes muestras; de esta manera, se pueden probar diferentes concentraciones de proteína sin gastar mucha muestra. Esto se debe a que en nuestro caso, al tratarse de tejido adiposo, la cantidad de muestra a cargar (debido a la escasa concentración de proteína) es elevada, por lo que el pool nos permite probar concentraciones sin gastar una muestra en su totalidad.

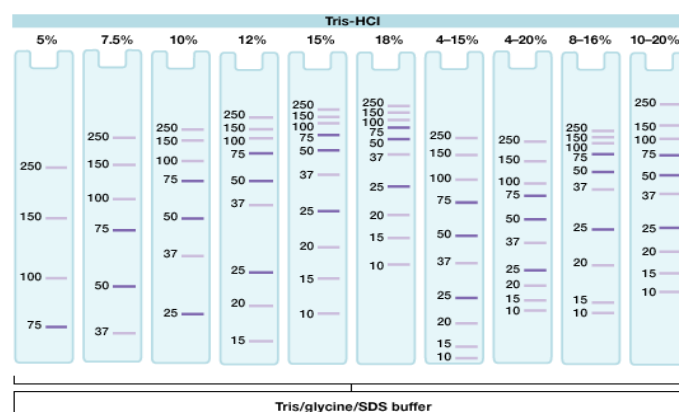
Partiendo de este pool se cargó un gel con las siguientes concentraciones de proteína: 10/20/30 µg. Una vez realizado el WB, se analizaron las cuantificaciones de PPAR $\gamma$ , y se vio que con las tres concentraciones antes mencionadas, la cuantificación era posible. Por esta razón, se decidió utilizar la concentración de proteína máxima que no necesitara parar la electroforesis (se explica en el siguiente párrafo); 15 µg. Con esta concentración se asegura una cuantificación óptima con un gasto de muestra ajustado.



Una vez que se conocía la concentración de proteína que había que cargar, observamos que se necesitaba cargar un volumen elevado de muestra. En tejido adiposo, en comparación con otros tejidos (hígado), hace falta un mayor volumen de muestra pues la proteína presente es menor. Por ello, a la hora de hacer los geles de poliacrilamida utilizamos cristales de 1 mm (en lugar de cristales de 0,75 mm), los cuales nos permitían cargar un volumen mayor de muestra en cada carril (44  $\mu$ L de muestra frente a 33  $\mu$ L de muestra que se cargaban con los cristales de 0,75 mm). Al disponer de un mayor volumen en cada carril, no teníamos que parar la electroforesis para cargar más muestra (lo que ocurría con los cristales de 0,75 mm). Como consecuencia, el proceso se llevaba a cabo sin tener que interrumpirlo y las bandas que se obtienen son más nítidas.

Una vez que se decidió que cristales había que usar, tuvimos que probar diferentes composiciones de los geles. Debido al peso molecular similar que tienen el PPAR $\gamma$  (55 Kd) y la  $\beta$  actina (42 Kd), que sirve como control interno, se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de acrilamida en el gel separador. Tras varias pruebas, decidimos que una concentración del 7,5% de acrilamida en el gel separador era la composición que mejor nos permitía cuantificar y diferenciar tanto la proteína de estudio (PPAR $\gamma$  55 Kd) como el control interno ( $\beta$  actina 42 Kd).

Cambiar la composición del gel para diferenciar ambas proteínas es necesario, porque en este caso los anticuerpos que se emplean son anti-mouse para ambos. Al emplear el mismo tipo de anticuerpo (que por otro lado no es 100% específico) y tener un peso molecular similar, conseguir un gel que nos permite diferenciarlos es esencial. Además, al tratarse de geles de 1 mm, esta concentración de acrilamida hace que el tamaño del poro permita el paso de todas las proteínas (incluso las que tienen un peso molecular alto). De este modo, se pone a punto la técnica no sólo para el PPAR $\gamma$ , también para otras proteínas (de pesos moleculares diferentes).



**Figura 5.** Nivel de definición de las diferentes bandas (Kd) en geles según distintas concentraciones de acrilamida.

### Electrotransferencia

Como se ha mencionado en el punto anterior, los geles que se han utilizado para la puesta a punto de esta técnica, son más gruesos que los que normalmente se utilizan. Por ello, cuando se hicieron las pruebas, vimos que siguiendo el protocolo del laboratorio la transferencia de proteínas del gel a la membrana no era completa.

Tras varias pruebas se aumentó el tiempo de transferencia de 30 minutos (es el tiempo que se tarda en hacer la transferencia con los geles de 0,75 mm) a 40 minutos, manteniendo el voltaje en 25 V.

Con este cambio se consigue que toda la proteína del gel se transfiera a la membrana, lo que nos permite hacer una cuantificación real de la proteína presente en las muestras (si toda la proteína del gel no se transfiere a la membrana, la cuantificación estará limitada por errores de procedimiento y no tendrá ninguna validez).

Mientras se realizaban las pruebas de transferencia del PPAR $\gamma$ , se observó que las proteínas de alto peso molecular no se transferían del gel a la membrana con el procedimiento habitual en los geles de 1 mm. Tras consultar la bibliografía existente, se probó una variación en el procedimiento que se estaba usando; activar la membrana con metanol (como en el protocolo), pero luego utilizar un tampón de transferencia que no contiene metanol. De esta manera las proteínas de alto peso molecular se transfieren totalmente. Aunque en nuestro caso esta modificación no ha sido necesaria (pues tanto el PPAR $\gamma$  como la  $\beta$  actina tienen un peso molecular bajo), esta variación del protocolo permite utilizar la técnica de WB para la cuantificación/estudio de otras proteínas.

### Hibridación

Una vez que se ha completado la transferencia de proteína del gel a la membrana, se introduce esta en un tampón de bloqueo durante dos horas. El tampón de bloqueo, que contiene proteínas lacteas, sirve para "rellenar" los huecos que han quedado libres en la membrana con proteínas a las que los anticuerpos no van a unirse. De este modo conseguimos que los anticuerpos que utilizamos solamente se unan a las proteínas que se han transferido del gel.

Transcurridas las dos horas, se retira el tampón de bloqueo y se realizan tres lavados (de 10 minutos cada uno) con PBS Tween. Tras los lavados se añade el anticuerpo primario (que se unirá a las proteínas de la membrana) y se incuba la membrana (en un agitador) 90 minutos a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4°C. La dilución de anticuerpo empleada ha sido de 1:1000. El protocolo de la casa comercial proponía para el PPAR $\gamma$  un rango de dilución de 1:200 a 1:1000. En nuestro caso

hemos utilizado el de 1:1000, pues tras varias pruebas, se ha visto que permite una cuantificación adecuada con un gasto de anticuerpo ajustado.

Tras el periodo de incubación, se retira el anticuerpo primario (y se recupera para posteriores usos) y se lava la membrana tres veces con PBS Tween (10 minutos cada lavado). Tras los lavados, se añade el anticuerpo secundario (que tiene el fluoróforo) el cual se une al anticuerpo primario. En nuestro caso, la dilución de anticuerpo secundario utilizada ha sido de 1:5000. La dilución utilizada se ha decidido tras realizar pruebas con diferentes concentraciones de anticuerpo.

### Revelado

En este paso del WB, mediante diferentes reactivos (ECL substrate y luminol) y un equipamiento adecuado (ChemiDoc MP, Biorad), se consigue cuantificar la proteína existente en la muestra. En nuestro caso, al tomar imágenes de la  $\beta$  actina, ocurría que incluso en periodos muy cortos de exposición, la señal aparecía saturada (imposibilitando la cuantificación). Cuando esto ocurre, se retira el luminol del recipiente donde está la membrana y se vuelve a visualizar. Si de nuevo se da la saturación, se limpia la membrana con agua, y se repite el proceso de revelado desde el principio. Mediante este proceso se consigue optimizar el proceso y una señal más nítida (una cuantificación mejor).

Por otro lado, en este paso hay que programar el revelador de quimioluminiscencia (ChemiDoc) para obtener las imágenes de las bandas de proteína; hay que definir un tiempo de exposición (el tiempo durante el cual el ChemiDoc toma imágenes de la membrana) y el número de imágenes a tomar durante el tiempo de exposición. Una exposición demasiado prolongada hace que los reactivos emitan una señal que satura la imagen. Por el contrario, una exposición demasiado breve puede hacer que la cuantificación sea menor que la real (los reactivos no han estado en contacto suficiente tiempo con las enzimas). Tras varias pruebas, se definieron tanto el tiempo de exposición como el número de imágenes a tomar durante este tiempo para conseguir una cuantificación óptima.

### Stripping

Tal y como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, el proceso de stripping permite "borrar" un WB pero sin dañar las proteínas adheridas a la membrana, permitiendo la re-cuantificación de estas.

Para poner a punto el WB para el PPAR $\gamma$ , en un primer momento se empleó un "hard stripping" donde se le añade a la membrana un stripping buffer (con  $\beta$  mercaptoetanol, Tris HCl, SDS y agua desionizada) y se incuba en agitación a 50°C durante 45 minutos. Una vez que se ha incubado, se tira el buffer y se lava la membrana tres veces con PBS Tween durante 10 minutos

(cada lavado) para retirar todo el stripping que pueda quedar en la membrana.

Tras bloquear la membrana y volverla a incubar con anticuerpos primario y secundario (esta vez para  $\beta$  actina), se observó que las cuantificaciones resultantes eran más bajas de lo esperado. El motivo era que las características de este stripping (tanto por el buffer empleado como por la temperatura aplicada a la membrana) "borraban demasiado" la membrana, llevándose parte de la proteína. Como consecuencia, las señales cuantificadas de  $\beta$  actina no eran las reales (estaban por debajo) por lo que no se podían usar como control interno.

En este punto, se probó a hacer un "mild stripping", cuyo objetivo es el mismo que el del "hard stripping", pero menos agresivo. Se prepara el stripping buffer y se realizan 2 lavados de 10 minutos a la membrana. Después, se vuelve a lavar la membrana 3 veces con PBS Tween (10 minutos cada lavado) y se incuba con anticuerpo primario.

Tras hacer las pruebas pertinentes, las cuantificaciones de  $\beta$  actina obtenidas fueron las esperadas, por lo que esta técnica demostró ser mejor para la puesta a punto del WB para PPAR $\gamma$ .

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 21.0 (SPSS inc. Chicago, IL, USA). La distribución normal de los datos obtenidos fue confirmada utilizando el test Shapiro-Wilks.

Se comparó el grupo control con el grupo tratado con una t de Student y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Una vez puesta a punto la técnica de WB para PPAR $\gamma$ , se utilizó para cuantificar la expresión de PPAR $\gamma$  en muestras de dos estudios realizados en ratas. Uno de los estudios se realizó en ratas con obesidad genética, y el otro estudio se realizó en ratas con obesidad dietética.

### Experimento en ratas Zucker (*fa/fa*)

Las ratas Zucker (*fa/fa*) son el modelo animal más utilizado y conocido de obesidad genética, pues aparte de esta característica, presentan alteraciones semejantes a las que se presentan en el síndrome metabólico humano (lo que las hace especialmente útiles para el estudio de enfermedades asociadas a dicho síndrome (11)). La mutación *fa* fue descubierta en 1961 por Lois Zucker en un cruce entre la cepa M de Merck y ratas Sherman. La obesidad que se presenta en estas ratas y que está vinculada a esta mutación, se hereda con carácter autosómico recesivo, y solo la manifiestan aquellos animales que son homocigotos para el alelo *fa* (11).

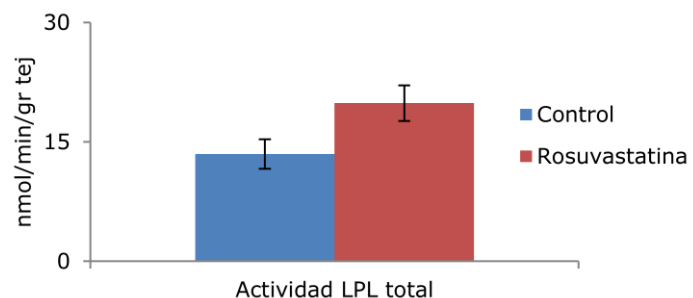
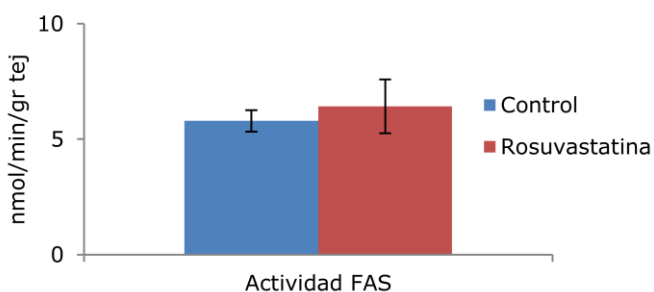
Este experimento parte de un modelo animal que presenta una "obesidad genética", donde los animales se alimentan con una dieta estándar y al que al grupo tratado se le administra Rosuvastatina.

**Tabla 1.** Peso corporal final y de tejido adiposo (TA) subcutáneo de ratas Zucker (*fa/fa*) alimentadas con dieta standard suplementada o no con rosuvastatina durante 6 semanas.

	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Peso TA subcutáneo (g)</b>
<b>Control</b>	407±13	36,9±2,7
<b>Rosuvastatina</b>	422±6	44,0±1,5 *

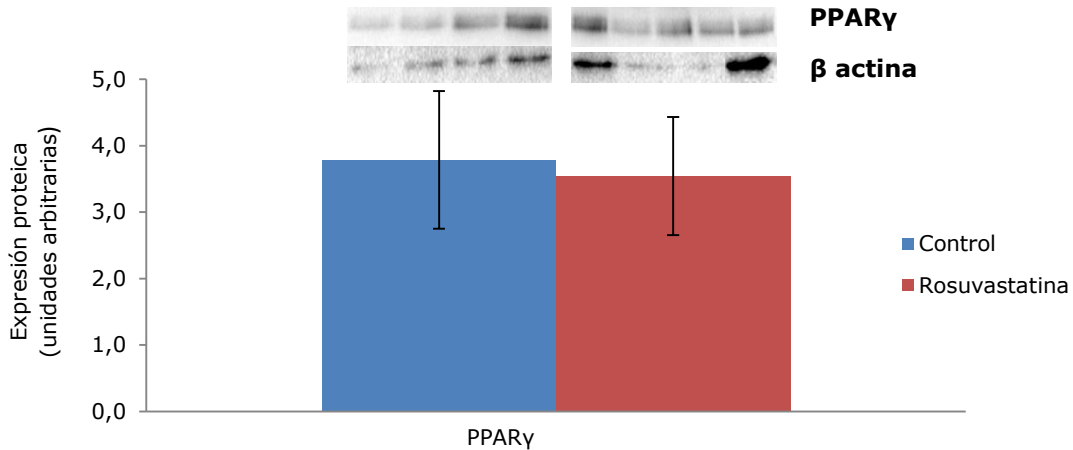
\* $P < 0,05$

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran un aumento en el peso del TA subcutáneo del 19% en el grupo tratado con rosuvastatina respecto al grupo control (Tabla 1).



**Figuras 6 y 7.** Actividad enzimática de la FAS y LPL total, expresadas en nanomoles originados por minuto y gramo de tejido, en el tejido adiposo subcutáneo de los grupos control y rosuvastatina.

El aumento en el peso observado ha ido acompañado de un aumento en la actividad de diferentes enzimas lipogénicos (Acido graso sintasa (FAS) y de captación de triglicéridos (Lipoprotein lipasa LPL) (Figuras 6 y 7)). Tras realizar el WB con las muestras de tejido subcutáneo de los animales de este estudio y cuantificar la expresión del PPAR $\gamma$ , se observó que no había diferencias significativas entre los grupos (como se puede ver en la figura 8).



**Figura 8.** Cuantificación de PPAR $\gamma$  (55 Kd) y  $\beta$  actina (42 Kd) de TA subcutaneo de ratas tratadas con dieta experimental durante 6 semanas.

### Experimento en ratas Wistar

La rata Wistar proviene de una línea de ratas albinas desarrollada para la investigación científica por el Wistar Institute de Philadelphia. Hoy en día es la cepa de ratas más utilizada en el mundo para fines de investigación (12).

En este experimento se parte de unos animales con normopeso a los cuales se les induce una "obesidad dietética" mediante una dieta HFHS. Al grupo resveratrol (RSV), se le ha administrado este polifenol junto con la dieta (30mg/kg peso/día).

Este polifenol ha sido ampliamente estudiado en los últimos años debido a que se le han atribuido múltiples funciones relacionadas con la salud, tales como capacidad antioxidante, protección contra enfermedades cardiovasculares, etc (13). Una de las funciones observadas en animales ha sido su capacidad para imitar la restricción calórica, lo que contribuye a una pérdida de peso (Barger *et al.* 2008). Esto hace esperar que los animales del grupo RSV, en comparación con los del grupo control, reduzcan su peso corporal, reduciendo a su vez la expresión del PPAR $\gamma$ .

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran una reducción tanto en el peso corporal como en el peso del TA perirrenal de los animales del grupo RSV (Tabla 2).

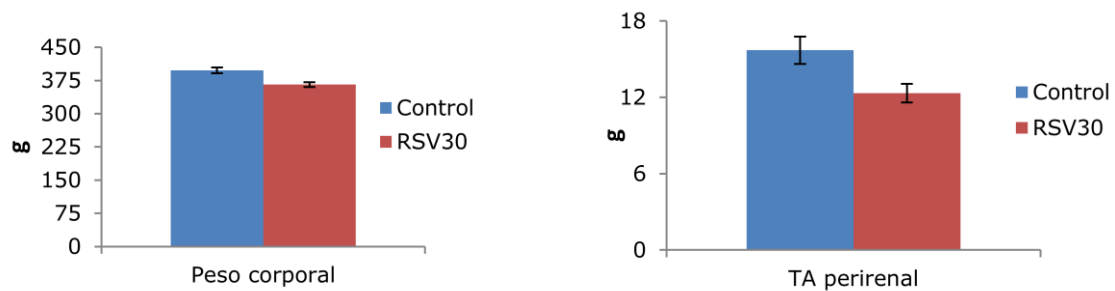
**Tabla 2.** Peso corporal y de TA perirenal de ratas Wistar alimentadas con una dieta HFHS suplementada o no con resveratrol durante 6 semanas.

	Peso corporal (g)	TA perirenal (g)
<b>Control</b>	398±7	15,70±1,07
<b>RSV 30</b>	366±5*	12,33±0,74*

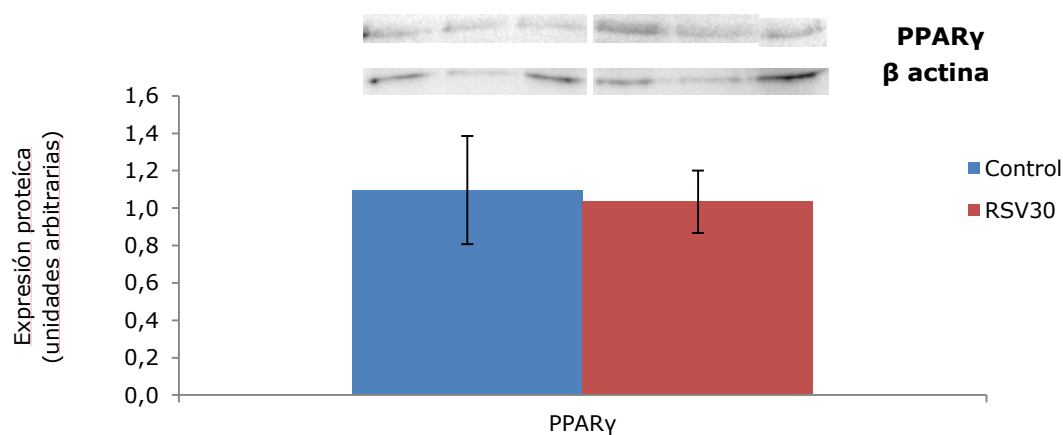
\*P<0,05

Con las muestras de tejido perirrenal de los animales de ambos grupos, se realizó un array para estudiar diferencias en los microRNAs relacionados con la obesidad, observando una reducción del mir129 (un tipo de microRNAs) en los animales del grupo RSV.

El mir129 está relacionado con la obesidad, y se ha propuesto el PPARγ como una de sus dianas (14). Por esta razón se decidió realizar un WB con las muestras del tejido perirrenal de los animales de este estudio y cuantificar la expresión del PPARγ. La cuantificación del PPARγ mediante WB demostró que no había diferencia entre los dos grupos.



**Figuras 9 y 10.** Peso corporal total y peso del TA perirrenal, expresados en gramo de tejido, de los animales de los grupos control y RSV del estudio.



**Figura 11.** Cuantificación de PPARγ (55 Kd) y β actina (42 Kd) de TA perirrenal de los grupos control y RSV alimentadas con una dieta HFHS durante 6 semanas.





## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El WB es hoy en día una técnica de uso cotidiano en el laboratorio, permitiendo la cuantificación de proteínas específicas en diferentes muestras. Los diferentes pasos que se deben seguir durante la realización, por un lado convierten al WB en una técnica larga, pero por otro lado permiten al investigador realizar ajustes en el protocolo.

En nuestro caso, las modificaciones realizadas en el protocolo que nos han permitido poner a punto la técnica para la detección del PPAR $\gamma$ , son las siguientes:

- Utilizar geles de 1 mm que permiten cargar mayor volumen de muestra por carril, por lo que se evita parar la electroforesis (útil en tejidos con bajo contenido en proteínas).
- Para conseguir una transferencia completa de geles de 1 mm a membrana, se necesita aumentar el tiempo de transferencia de 30 a 40 minutos.
- El mild stripping permite volver a incubar la membrana con otro anticuerpo sin dañar las proteínas que hay en ella.

Estos ajustes han demostrado su utilidad con muestras de animales de dos estudios diferentes.

Aparte de estos ajustes, se ha observado que cuando se utilizan geles de 1 mm de grosor, el tampón de transferencia no debe tener metanol, de lo contrario las proteínas de alto peso molecular no se transfieren. Este ajuste que se ha observado durante la puesta a punto de la técnica, y que en nuestro caso no nos ha hecho falta, sirve para la determinación de proteínas de alto peso molecular (>100 kd).

En conclusión, las modificaciones que se han realizado en el protocolo estándar del laboratorio, permiten al investigador utilizarlo para la detección de PPAR $\gamma$  en todo tipo de muestras. Esta variación del protocolo estándar, convierten la determinación de PPAR $\gamma$  por WB en una técnica puesta a punto y de rutina para todo el grupo.



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4354.
- (2) Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *Biomed Res Int* 2014;2014:361590.
- (3) Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods* 2006;38(4):283-293.
- (4) Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)* 2012 Mar;295(3):369-371.
- (5) MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010 Mar-Apr;61(2):171-177.
- (6) Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* 2003;274(1):1-15.
- (7) Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH. The erasable Western blot. *Anal Biochem* 1987 Feb 15;161(1):89-95.
- (8) Uauy R, Martinez JI, Rojas CV. Molecular nutrition, role of the PPAR system in lipidic metabolism and its importance in obesity and diabetes mellitus. *Rev Med Chil* 2000 Apr;128(4):437-446.
- (9) Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013 May;19(5):557-566.
- (10) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-254.
- (11) Aleixandre A, Miguel M. Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases. *Endocrinol Nutr* 2008 May;55(5):217-222.
- (12) Clause BT. The Wistar rat as a right choice: Establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *Journal of the History of Biology* 1993;26(2):329-349.
- (13) Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 2011 Nov 2;14(5):612-622.
- (14) <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>

