



## **USO DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT PARA EL ANÁLISIS DEL PROCESO DE DIGESTIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE LA PASTA DE AJONJOLÍ EN DIFERENTES COMPARTIMENTOS DIGESTIVOS DE LECHONES ALIMENTADOS CON DIETAS CONTENIENDO PASTA DE AJONJOLÍ.**

Díaz Zepeda, L. E.<sup>1</sup> Aguilera Barreyro, A.<sup>1</sup> Gómez Soto J.<sup>1</sup> Reis de Souza, T. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. [quique.3092@hotmail.com](mailto:quique.3092@hotmail.com), [araba@uaq.mx](mailto:araba@uaq.mx), [jggs58@hotmail.com](mailto:jggs58@hotmail.com), [tercia@uaq.mx](mailto:tercia@uaq.mx)

### **RESUMEN**

En los contenidos de los compartimentos digestivos se encuentran proteínas de tipo exógeno (proteína dietaria) y endógeno (enzimas, células de descamación, microorganismos, etc.), lo que hace difícil diferenciar la procedencia de estas proteínas. El Western Blot es una técnica molecular utilizada para la detección de proteínas específicas en una mezcla de varios elementos. El objetivo de este trabajo fue hacer uso del Western Blot para detectar proteínas específicas de pasta de ajonjolí con un peso molecular (PM) de 62, 36, 15 y 14 kDa, en los diferentes compartimentos digestivos de lechones destetados alimentados con una dieta conteniendo pasta de ajonjolí en diferentes horas postconsumo. Estas proteínas específicas se seleccionaron con base a su separación electroforética y a su presencia desde el contenido del estómago hasta el del íleon de lechones en diferentes horas postconsumo. Para la técnica se empleó un anticuerpo contra proteínas de los PM antes mencionados, las cuales se obtuvieron de su separación por electroforesis, tal anticuerpo fue generado en conejos de raza Nueva Zelanda utilizando como adyuvante acrilamida como sustituto del adyuvante de Freund; además se empleó un segundo anticuerpo comercial de burro contra anticuerpo de conejo marcado con peroxidasa para su identificación por medio de un cromógeno. En contenidos de estómago se observaron proteínas de 62 y 36 kDa y difusamente de 14-15 kDa a las 9 h. En el contenido de íleon se pudo observar proteínas de 14 y 15 kDa a las 3 y 6 h postconsumo. La presencia de proteínas de 14 y 15 kDa a nivel estomacal e ileal indica que no fueron digeridas en el tracto digestivo. Se ha visto que la técnica ha tenido eficacia para encontrar algunas de estas proteínas a lo largo del proceso de digestión.

### **1. INTRODUCCIÓN**

Es importante conocer la digestibilidad de las proteínas en los diferentes compartimentos digestivos, por lo cual es necesaria la elaboración de métodos experimentales que nos permitan corroborar más precisamente la cinética digestiva de ciertas proteínas que aparentan ser más resistentes a la digestión durante su trayecto por el sistema digestivo. Por tal motivo es necesaria la implementación de nuevas técnicas que faciliten la detección de proteínas mediante su alta especificidad y sensibilidad, siendo el Western Blot una técnica relativamente rápida, detecta proteínas específicas y en cantidades de picogramos, lo cual la vuelve una técnica ideal en cuanto a investigación para digestibilidad de proteínas.

En los contenidos de los compartimentos digestivos se encuentran proteínas de tipo exógeno (proteína dietaria) y endógeno (enzimas, células de descamación, microorganismos, etc.), lo que hace difícil diferenciar la procedencia de estas proteínas.



## 2. TEORÍA

La interacción antígeno-anticuerpo, ésta es una relación biomolecular similar a la interacción enzima-sustrato, con la importante diferencia que no conduce a una alteración química irreversible en antígeno o anticuerpo. La alta especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo ha permitido el desarrollo de una amplia gama de pruebas inmunológicas, éstas difieren en su rapidez y sensibilidad; algunas son meramente cualitativas y otras son cuantitativas (Kindt, 2007)

Gracias a la técnica conocida como Western Blot es posible la identificación de una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas, tales proteínas se separan por medios electroforéticos en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Estas bandas de proteínas se transfieren a una membrana sintética de manera que quedan inmovilizadas y las bandas individuales de proteína de interés se identifican al inundar la membrana con anticuerpo policlonal o monoclonal radio marcado unido a enzimas, mediante sistemas especialmente diseñados para su tinción, la ventaja de emplear el electroblotting se encuentra en su corta duración de entre 30 minutos a unas cuantas horas (Calderon, 2007)

La interacción entre antígeno y anticuerpo depende de cuatro tipos de fuerzas no covalentes: enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos entre cargas opuestas, interacciones hidrófobas y fuerzas de van der Waals, la fuerza combinada de dichas interacciones entre el sitio de unión del antígeno y el epítipo es la afinidad de antígeno por el epítipo. Cuando los anticuerpos con baja afinidad se unen a su epítipo tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de mayor afinidad tienden a unirse con mayor firmeza y la unión se mantiene por más tiempo. Tal característica es de vital importancia para evitar la disociación de la unión durante los lavados de la técnica (Kindt, 2007)

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

**Producción de anticuerpos policlonales de proteínas específicas de PA:** Para determinar las proteínas específicas a las que se producirían los anticuerpos policlonales, se realizó la separación electroforética de proteínas contenidas en las digestas de estómago e íleon de lechones alimentados con dietas incluyendo pasta de ajonjolí a diferentes horas postconsumo (3, 6, 9 y 12 h). Las muestras de digesta se desgrasaron en frío con metanol-cloroformo (Folch *et al.*, 1957) y se desnaturalizaron con dodecilsulfato de sodio (SDS) contenido en el buffer de carga y calentándolas en baño maría a ebullición durante 5 min. Las fracciones de proteínas de las muestras de digesta se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE (SDS-*polyacrylamide gel electrophoresis*) (Laemmli, 1970) a una concentración de acrilamida de 14% para poder evaluar las proteínas de alto y bajo peso molecular respectivamente. Las electroforesis se corrieron a 120 V. Los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 y se fotografiaron mediante un fotodocumentador Bio-Rad para analizar los geles por medio del programa Quantity One de Bio-Rad para estimar el peso molecular (PM) de las proteínas que conforman cada fracción proteica en la pasta, comparando su movilidad electroforética con la de un estándar de PM de proteínas de amplio espectro marca Bio-Rad (161-0317 Bio-Rad). Al analizar los geles se identificaron 4 bandas proteicas (64, 36, 15 y 14 kDa) que se observaron desde el estómago hasta el íleon a diferentes horas posconsumo. Teniendo estas bandas ya identificadas, se procedió a separar electroforéticamente las proteínas de la pasta de ajonjolí desgrasada y desnaturalizada con SDS como anteriormente se describió. Se cargaron 20 µg de proteína soluble (Bradford, 1976) de la pasta de ajonjolí en cada pozo del gel de acrilamida al 14%. Las bandas de los geles se evaluaron para estimar el peso molecular (PM) de las proteínas que conforman cada fracción proteica en la pasta. Las bandas correspondientes a 62, 36, 15 y 14 kDa de los geles de poliácridamida se recortaron y se homogeneizaron en 1.5 ml de PBS a pH 7.4. Con este extracto de proteínas antigénicas-acrilamida se inmunizaron



intradérmicamente cuatro conejos de raza Nueva Zelanda durante cuatro semanas en intervalos de una semana. En cada semana se realizó un sangrado de la vena marginal de la oreja previa a cada inmunización para determinar la titulación de anticuerpos mediante el procedimiento de Dot-Blot, usando como control el suero pre-inmunización de cada conejo (Díaz *et al.*, 2014).

#### **Determinación de proteínas específicas de pasta de ajonjolí en digestas por Western Blot:**

Para determinar las proteínas específicas de pasta de ajonjolí sobre las que se produjeron los anticuerpos policlonales, se realizó la separación electroforética de proteínas contenidas en las digestas de estómago e íleon de lechones alimentados con dietas incluyendo pasta de ajonjolí a diferentes horas postconsumo (3, 6, 9 y 12 h). Las muestras de digesta se desgrasaron en frío con metanol-cloroformo (Folch *et al.*, 1957) y se desnaturalizaron con dodecilsulfato de sodio (SDS) contenido en el buffer de carga y calentándolas en baño maría a ebullición durante 5 min. Las fracciones de proteínas de las muestras de digesta se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970) a una concentración de acrilamida de 15% para poder evaluar las proteínas de alto y bajo peso molecular respectivamente. Las electroforesis se corrieron a 120 V. Para realizar la transferencia se hizo uso de membranas de nitrocelulosa 0.45  $\mu\text{m}$  (162-0115 BioRad). Para realizar la transferencia de las bandas de proteína del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa el procedimiento fue el siguiente: en el casete de transferencia de: Esponja, papel filtro, gel de electroforesis 1mm 15% acrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro, esponja. Posteriormente se realizó el electroblotting en buffer de transferencia (Tris, Glicina, Metanol pH8.3) durante 45 minutos aproximadamente a 110V, se introdujo un refrigerante y un agitador magnético durante la transferencia para evitar el sobrecalentamiento de la solución. Tras la transferencia se bloqueó la membrana con buffer de bloqueo (PBS Tween 20 y leche descremada) durante una hora. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 por 5 minutos en agitación y se añadió buffer de bloqueo con anticuerpo primario de conejo contra proteínas de pasta de ajonjolí en concentración 1:25, se incubó el anticuerpo durante la noche en refrigeración. Al día siguiente se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS-Tween 20, se bañó nuevamente la membrana con buffer de bloqueo y se añadió anticuerpo secundario comercial de burro contra IgG de conejo (A120-208P Bethyl) en concentración 1:2000. Este anticuerpo se dejó incubar en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente, tras la incubación se realizaron los mismos lavados, para revelar las proteínas se empleó el kit NovaRED Peroxidasa (SK-4800 Vector). La documentación de los resultados se realizó mediante el uso de un scanner a resolución de 1600 ppi.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados presentados son preliminares pues tras varias transferencias no se ha podido optimizar el método para obtener una resolución óptima, se cree que podría ser la afinidad del anticuerpo con su epítipo y que al realizar los lavados sufren disociación, sin embargo, al reducir los lavados se presenta un mayor ruido en la imagen, también se cree que puede ser el kit de revelado pues se han encontrado bandas de proteínas de interés que a los pocos minutos de realizar el revelado tienden a desvanecerse.

En la Imagen 1, se presenta el Western Blot de muestras de digesta de estómago a las 9 h y de íleon a las 3 y 6 h. En el carril correspondiente a la muestra de estómago a 9 h posconsumo (a) se pueden observar bandas más definidas con un peso molecular de 36 y 62 kDa y bandas muy poco definidas de 14-15 kDa. En la muestra de íleon a 3 h posconsumo (b) se observa una banda de entre 14 y 15 kDa, mientras que en la muestra de íleon a 6 h posconsumo (c) se observan 2 bandas correspondientes a 14 y 15 kDa.



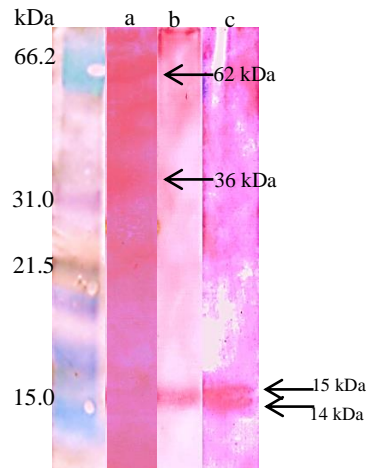


Imagen 1. Western Blot: a) estómago 9 h postconsumo, b) íleon 3 h postconsumo, c) íleon 6 h postconsumo)

Las proteínas con pesos moleculares cercanos entre 12 y 14 kDa se han catalogado como alergénicas de la familia 2S albuminas, que son resistentes a la digestión estomacal e intestinal por lo cual su presencia en el íleon nos indica su indigestibilidad (Moreno *et al.*, 2005)

## 5. CONCLUSIONES

El Western Blot es una técnica que puede emplearse para la detección de proteínas específicas de pasta de ajonjolí, sin embargo, la resolución obtenida no ha sido la esperada, por lo que se debe continuar optimizando la técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* Vol. 72, 1976, pp. 248-254.
2. Calderón P, R. V. Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología. 2007, pp41
3. L.E. Díaz, A. Aguilera, T. Reis, J. Gómez, L. Anaya, T. Gasca, G. Mariscal, G. Bernal, C. Betancourt, "Producción de anticuerpos policlonales de proteínas de pasta de ajonjolí". XI encuentro Participación de la mujer en la ciencia. León, Guanajuato. 2014.
4. J. Folch, M. Lees and G.H.S. Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues", *J. Biol. Chem.*, Vol. 226, 1957, pp. 497-509.
5. H.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4". *Nature*, Vol. 227, 1970, pp. 680-685.
6. F.J. Moreno, B.M. Maldonado, N. Wellner, E.N. Mills, "Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.)". *Biochimica et Biophysica Acta* 1752, 2005, pp. 142 – 153.
7. T.J. Kindt, R.A. Goldbsy, B.A. Osborne, "Inmunología de Kuby", 6° Edición, McGraw Hill, 2007, pp 75,76,79,81,145, 158.
8. J. Rivest, J.F. Bernier and C. Pomar, "A dynamic model of protein digestion in the small intestine of pigs". *J. Anim. Sci.*, Vol. 78, 2000, pp. 328–340.