

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán
Campo 1

“Evaluación del efecto de dos mezclas de ácidos grasos
sobre la inflamación y el estrés del retículo
endoplásmico en células hepáticas con esteatosis”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL PULIDO MUNGUÍA

ASESOR:

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

COASESOR:

Dra. Lyssia Castellanos Tapia



Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

«Si je ne le suis pas, que Dieu me place là. Et si je le suis, que
Dieu me garde là. »

Juana de Arco

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por brindar los recursos y la infraestructura necesaria para la realización de este proyecto.
- ❖ A la Dra. Lyssia Castellanos Tapia, por acogerme en su equipo de trabajo y darme su confianza, asesoría y enseñanzas para la elaboración de este proyecto, así como el otorgarme la oportunidad de introducirme al mundo de la investigación.
- ❖ A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por su coasesoría y por brindarme los fundamentos teóricos y prácticos en el área biológica, los cuales fueron de suma importancia en mi formación profesional.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de la Máxima Casa de Estudios y hacerla parte de mi vida.
- ❖ A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en especial a la sección de Bioquímica y Farmacología Humana y al Laboratorio Experimental Multidisciplinario por hacerme enamorar en las áreas Biológicas y Tecnologías Farmacéuticas

DEDICATORIAS

- ❖ A mi madre, Estela Felisa Munguía Nicolas, por motivarme a seguir adelante sin importar las adversidades que se lleguen a presentar y por brindarme las herramientas para lograr mis objetivos.
- ❖ A mi padre, Adalberto Pulido Flores, por darme palabras de aliento a lo largo de la carrera
- ❖ A mis abuelos León Munguía Álamo (Q.E.P.D) y Felisa Nicolas Pérez (Q.E.P.D) por haberme hecho la persona que soy ahora, un hombre de bien, hecho y derecho.
- ❖ A mis hermanos Oscar Alberto y Jesús Heriberto por ser mis confidentes y escucharme en cualquier momento, por motivarme a salir adelante y por hacer de mi vida un carnaval llena de risas y diversión.
- ❖ Omar Badillo, por haber llegado a mi vida y caminar este trayecto a mi lado, demostrándome su apoyo incondicional en cada momento y por enseñarme que se tienen que disfrutar la vida en los buenos y malos momentos y dejar a lado las preocupaciones.
- ❖ A mis mejores amigos de la universidad Paco, Sofí, Kari y Omar, saben que los adoro con todo mi corazón y que siempre podrán contar conmigo en cualquier momento, con ustedes aprendí un concepto más íntimo de compañerismo y amistad, así como de trabajar en equipo en cualquier situación, espero que sigamos manteniendo nuestra más sincera amistad y les deseo de todo corazón que tengan una muy buena vida profesional.
- ❖ A la vida, por haberme permitido conocer al amor de mi vida, por llenarme de experiencias únicas y darme la facultad y la capacidad de seguir adelante.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN
EL LABORATORIO DE NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA EN CIENCIAS
LYSSIA CASTELLANOS TAPIA

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivo General	3
3. Objetivo Particular	3
4. Hipótesis	3
5. Marco Teórico	4
5.2.1 Hígado	4
5.3 Enfermedad Hepática no ligada al Alcohol.....	6
5.3.1 Lipotoxicidad en Hígado	7
5.3.2 Inflamación.....	10
5.3.3 Estrés del Retículo endoplásmico	12
5.4 Factores de prevención y Desencadenantes de la NAFLD	14
5.4.1 Dieta mediterránea.....	14
5.4.2 Química de los Ácidos Grasos.....	15
5.4.3 Ácidos Grasos Omega 3	16
5.4.4 Ácidos Saturados	19
6. Metodología experimental.....	21
6.1 Alimentación a ratones de la cepa BALB/c a Esteatosis	21
6.2 Obtención de Cultivos Primarios	21
6.3 Preparación del complejo de albúmina y ácido graso	22
6.4 Estimulación de los Hepatocitos primarios con la mezcla de ácidos grasos	23
6.5 Técnica de Rojo Oleoso.....	23
6.5 Extracción de proteínas	24
6.6 Cuantificación de las proteínas	25
6.7 Expresión de proteínas por Western Blot	26
6.8 Transferencia.....	26
6.9 Diagrama de diseño del estudio	27
6.9.1 Diagrama general.....	27
6.9.2 Diagrama de obtención del cultivo primario hepático	28
6.9.3 Diagrama de tratamientos	29
6.9.3 Diagrama de tinción con rojo oleoso.....	31
6.9.4 Diagrama de extracción de proteínas.....	32
6.9.5 Diagrama Cuantificación de Proteínas	33

6.9.6 Diagrama de expresión de proteínas por western blot.....	34
7. Resultados	35
7.1 Tinción con Rojo Oleoso.....	35
7.2 Western blots.....	36
7.2.1 Proteínas de la Señalización inflamatoria	36
7.2.1 Proteínas de la Señalización del Estrés del Retículo endoplasmático.....	41
8. Discusión	43
8.1 Efecto de la mezcla de ácidos grasos en el cultivo hepático.....	43
8.2 Vía de señalización inflamatoria	44
8.3 Vía de la señalización del Estrés del retículo endoplásmico	45
9. CONCLUSIÓN.....	46
10. Referencias	47
Anexo A.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista anterior del Hígado	4
Figura 2: Metabolismo completo de los AG.....	8
Figura 3: Mecanismo propuesto para desarrollar en una célula común.	9
Figura 4: Vías de señalización de la insulina.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5: Regulación de las acciones de la insulina. ...	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6: Desarrollo de NASH y HCC a partir del hígado sano... definido.	¡Error! Marcador no
Figura 7: Etapas del daño al hígado	11
Figura 8: Estrés del retículo y su asociación con el desarrollo de resistencia a la insulina.....	13
Figura 9: El ácido linoleico y el ácido α -linoleico se convierten en ácidos grasos poliinsaturados.....	17
Figura 10: Mecanismo benéfico del Omega 3	19
Figura 11: Diferentes cambios metabólicos implicados después del consumo de diferentes tipos de ácidos grasos.	20
Figura 12: Formación del complejo Cu-BCA.....	25
Figura 13: Western blots para STAT3 y p-STAT3.....	36
Figura 14: Western blots para Erk $\frac{1}{2}$ y p-Erk $\frac{1}{2}$ -.....	38
Figura 15: Western blots para p-JNK.....	39
Figura 16: Western blots para p-ATF 6	41
Figura 17: Western blots para p-EIF2 α	42
Figura 18: Western blots de células hepáticas	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efecto de los tratamientos de AG en cultivo primario hepático.....	35
Tabla 2: Efecto de los tratamientos de AG en cultivo primario hepático con esteatosis	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Fold Change de la expresión relativa de las proteínas de STAT3.....	37
Gráfica 2: Fold Change de la expresión relativa de las proteínas de p- STAT3	37
Gráfica 3: Fold Change de la expresión de las proteínas de Erk ½	38
Gráfica 4: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-Erk ½.....	39
Gráfica 5: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-JNK.....	40
Gráfica 6: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-ATF 6	41

Glosario de abreviaturas

AGS: Ácidos grasos saturados

AGL: Ácidos grasos libres

ATF-6: Factor activador de la transcripción 6

ATP: Adenosin trifosfato

EIF2 α : Factor de iniciación de la traducción

ER: Estrés del retículo endoplásmico

ERK: Kinasa del retículo endoplásmico

IL6: Interleucina 6

JNK: Kinasa c-Jun N-terminal

MD: Dieta mediterránea

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no ligado al alcohol

NASH: Esteohepatitis no ligada al alcohol

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TG: Triglicéridos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UPR: Respuesta al desdoblamiento de proteínas

1. Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) es una manifestación hepática del síndrome metabólico, la cual se caracteriza por los siguientes factores de riesgo: obesidad abdominal, triglicéridos altos, colesterol, hipertensión e hiperglucemia en ayuno (Aleixandre & Miguel, 2007).

La NAFLD abarca un amplio espectro de trastornos hepáticos, que van desde la esteatosis simple hasta la forma más grave, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), que puede progresar a cirrosis o carcinoma hepatocelular.

El distintivo de NAFLD es la acumulación de triglicéridos (TG) en el citoplasma de los hepatocitos, esto se debe a un desequilibrio entre la adquisición de lípidos y la eliminación.

Por otro lado, la NASH, la forma más grave de la enfermedad, se caracteriza por esteatosis, inflamación hepática y puede incluir diversos grados de fibrosis.

Las causas que están vinculadas a la NAFLD son la dieta y la conformación génica del individuo. Las dietas ricas en calorías están asociadas con la esteatosis hepática, en parte debido a la hipertrofia del tejido adiposo, en particular la acumulación de tejido adiposo visceral. Las dietas altas en calorías también están asociadas con el desarrollo del estrés del retículo endoplásmico e inflamación al aumentar aún más los ácidos grasos libres circulantes.

El efecto de las dietas ricas en grasas sobre la esteatosis hepática en la histología de NAFLD son diferentes dependiendo de la composición de la dieta. Específicamente, se ha informado que los ácidos grasos saturados (AGS) estimulan la obesidad y la esteatosis hepática, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados mejoran la esteatosis hepática.

En las últimas décadas, la dieta mediterránea (MD) que se caracteriza por una alta ingesta de alimentos a base de plantas (principalmente grano entero), el aceite de oliva como principal fuente de grasa, cantidades moderadas de productos lácteos, moderado consumo de pescado y carne, así como el consumo de vino consumido con las comidas y un estilo de vida activo (Rosa Guillamón et al., 2018); se ha promovido como una de las dietas más saludables asociadas con un menor riesgo de enfermedades crónicas importantes y con una mejor esperanza de vida, reduciendo la NAFLD, puesto que esta dieta basada en plantas tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y mono insaturados (PUFA y MUFA). (Della Corte & Nobili, 2017).

El presente estudio pretende evaluar el efecto que tienen dos mezclas de ácidos grasos, saturados e insaturados sobre este padecimiento, por lo que se ha planteado usar mezclas de ácidos grasos Palmítico, Ácido Mirístico, Ácido Palmitoleico, Ácido Oleico y Omega 3 similares a lo encontrado en plasma en personas que consumen una dieta alta en ácidos grasos saturados y una dieta tipo mediterránea sobre los procesos de inflamación y estrés de retículo endoplásmico en los hepatocitos.

2. Objetivo General

Evaluar el efecto que tienen dos mezclas de ácidos grasos similares encontrados en la dieta tipo occidental y mediterránea mediante la estimulación en cultivos hepáticos primarios de ratones para observar los cambios en las rutas de señalización de la inflamación y del estrés del retículo endoplásmico.

3. Objetivo Particular

- Evaluar el efecto protector que tienen los ácidos grasos insaturados en cultivo primario de células hepáticas sanas y con esteatosis sobre las rutas de señalización de la inflamación y del estrés del retículo endoplasmático.

4. Hipótesis

Si hay un cambio en la estimulación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados en cultivo primario hepático, entonces se producirá un cambio en el desarrollo de la esteatosis hepática.

5. Marco Teórico

5.2.1 Hígado

El hígado es un órgano responsable en los procesos de metabolización de agentes endógenos (proteínas, lípidos y carbohidratos) y de biotransformación de agentes exógenos (fármacos), conformado por dos lóbulos (izquierdo y derecho), el cual es perfundido por la gran arteria hepática, la cual proporciona el 25% del flujo sanguíneo oxigenado y por otra parte se encuentra la vena porta la que proporciona el 75% de la sangre restante y de nutrientes. (Yu & Shargel, 1999)

Figura 1: Vista anterior del Hígado

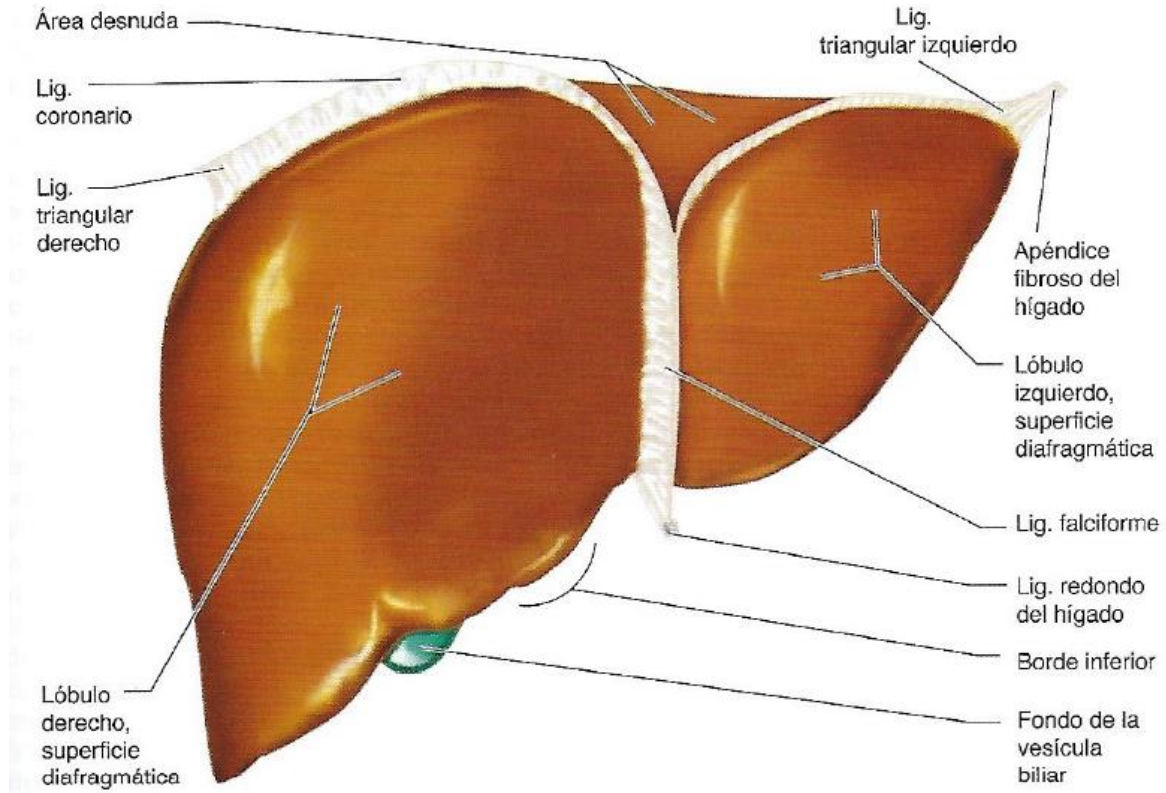


Figura 1. Vista anterior del Hígado y sus relaciones peritoneales (Pró, n.d.)

Las células del hígado están conformadas por dos grupos celulares, las células parénquimas y las células no parénquimas.

Empezando con las células no parénquimas, en este grupo se encuentran las células de Kupffer, macrófagos que corresponden el 80% hasta el 90% de la población total en el cuerpo.

Siguiendo con las células de stellate, que se encuentran en el espacio de Disse (un área pequeña entre las células endoteliales y los hepatocitos) y almacenan el 75% del suministro de vitamina A del cuerpo. (Wang et al., 2011).

Por otro lado, las células parénquimas son conformadas por los hepatocitos, los cuales forman aproximadamente el 80 % de este órgano. Se disponen formando láminas de una célula de espesor que se unen unas con otras a modo de esponja. Tienen una vida relativamente larga, puesto que son renovadas aproximadamente cada 5 meses, aunque depende de si hay o no procesos de regeneración. Cuando hay daños en el hígado los hepatocitos tienen una gran capacidad de proliferación y regeneración. (Meg et al., 2018).

Los hepatocitos son células poliédricas que se organizan en placas o cordones, pueden ser uni o binucleados que delata la intensa actividad metabólica que presentan estas células.(Rojas Lemus et al., 2017).

Cada hepatocito cumple con cientos de funciones, tanto endocrinas como exocrinas, entre ellas las más importantes:

- Almacenamiento de glucógeno
- Biotransformación de agentes endógenos y exógenos
- Síntesis de Lipoproteínas
- Síntesis de colesterol y ácidos biliares
- Oxidación de ácidos grasos

Cabe mencionar que cuando no hay una deficiencia en la oxidación de los ácidos grasos y empieza a haber una sobre acumulación de estos en el hígado, se empieza a producir la enfermedad hepática no ligada al alcohol.

5.3 Enfermedad Hepática no ligada al Alcohol

Como parte de las características del síndrome metabólico se encuentra el desarrollo de la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, por sus siglas al inglés) que es la causa más común de enfermedad hepática crónica en los países occidentales. El término NAFLD se refiere a un exceso de lípidos en el hígado que no resulta del consumo de alcohol o causas secundarias, como medicamentos, infecciones virales o condiciones endocrinas. El sello distintivo del NAFLD es la acumulación intracelular de lípidos, lo que resulta en la formación de vesículas de lípidos dentro de los hepatocitos. Esta acumulación es el resultado de un desequilibrio entre la síntesis de lípidos y la oxidación. A partir de la condición benigna de la esteatosis simple. (Bellanti et al., 2017).

La NAFLD es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) y se encuentra fuertemente asociada a la obesidad. (Berlango et al., 2016)

Una gran cantidad de experimentos realizados demostraron que los ácidos grasos saturados, particularmente el ácido palmítico (C16:0), el ácido mirístico (C14:0), y los ácidos grasos libres (AGL) más abundantes en la dieta son importantes en el desarrollo de NAFLD, no obstante, pueden desencadenar también lipotoxicidad hepática.

Por el contrario, los ácidos grasos insaturados como son el ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1) y omega 3 (18:3 ω -3) son menos tóxicos y pueden contrarrestar la toxicidad inducida por el ácido palmítico o el ácido mirístico. Por otra parte, la suplementación con ácido oleico atenúa la apoptosis en la línea celular de hepatocitos desafiados con ácido palmítico. (Li et al., 2018).

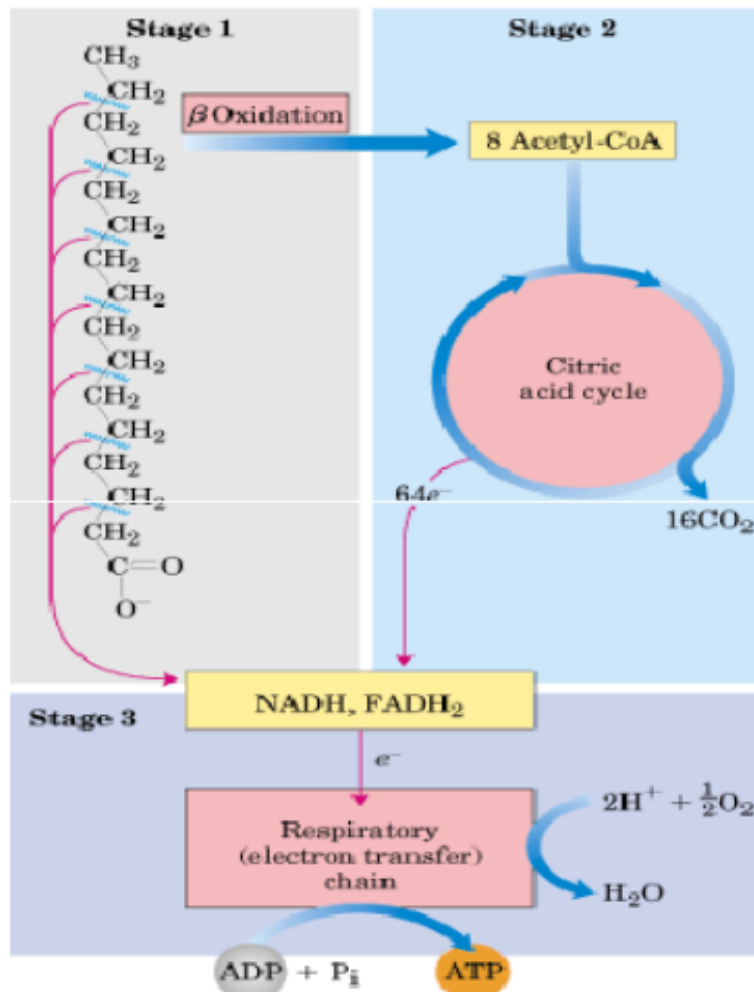
5.3.1 Lipotoxicidad en Hígado

Cuando los AG saturados como el ácido palmítico y el ácido mirístico están en concentraciones altas, se suscita la lipotoxicidad, esto hace referencia a los efectos deletéreos del exceso de los AG, y la acumulación de la grasa ectópica que provocan muerte celular o disfunción orgánica. El consumo excesivo de alimentos ricos en carbohidratos, combinado con el aumento de la liberación excesiva de AG sobrepasa el límite de almacenamiento y la capacidad de oxidación en tejidos, como el hígado.

Los AG son redirigidos a vías metabólicas dañinas no oxidativas, con acumulación intracelular de metabolitos tóxicos.

Al existir una gran cantidad de AG disponibles, y si los requerimientos celulares no precisan de ellos, entonces se produce una β -oxidación compensatoria, para mantener el equilibrio dentro de la célula, ya que la β -oxidación es un proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren remoción, mediante la oxidación, de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas acetyl-CoA, que serán posteriormente oxidados en la mitocondria para generar energía química en forma de (ATP). (Devlin, T. M).

Figura 2: Metabolismo completo de los AG



Fase I. En la β - oxidación, se oxidan a acetyl CoA

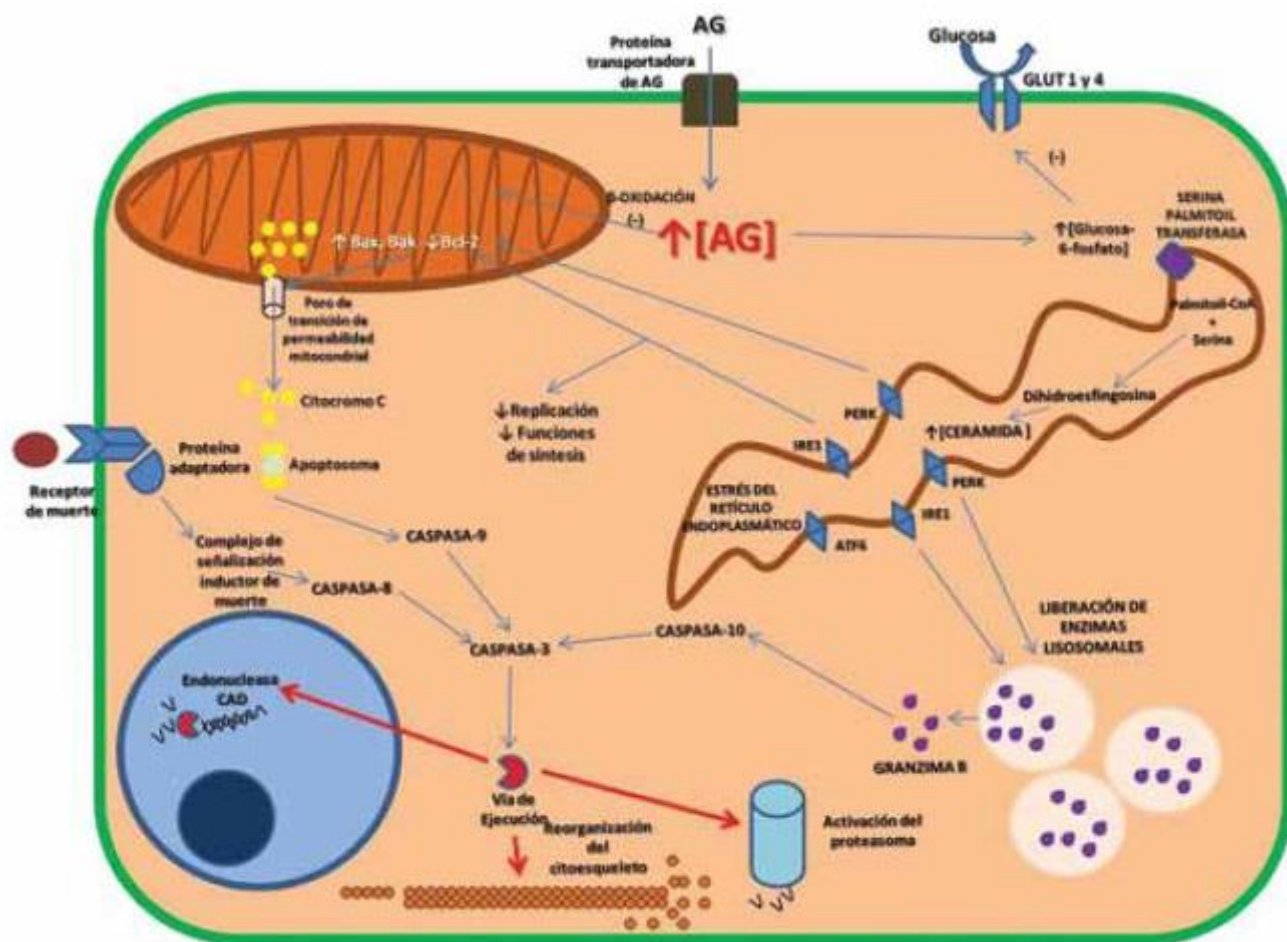
Fase II. La acetyl CoA que se produjo, entra al Ciclo de Krebs, en donde se oxida y en donde se forman las coenzimas reducidas

Fase III. Las coenzimas reducidas NADH y FADH₂ se van a cadena respiratoria en donde se oxidan.

FIN: CO₂, H₂O y ATP

Al final cuando la oxidación compensatoria de los AG falla, éstos entran a vías metabólicas alternativas para ser degradados o incorporados a otras moléculas, aunque subsecuentemente la hidrólisis generaría nuevos sustratos para las vías alternativas. En células como, en los hepatocitos se han propuesto mecanismos por los cuales el exceso de AG desencadenaría el fenómeno de lipotoxicidad. (Martinez J, Torres P, 2013)

Figura 3: Mecanismo propuesto para desarrollar lipotoxicidad en una célula común.



Se muestra una célula en donde puede ocurrir los diferentes mecanismos de lipotoxicidad: vía de la ceramida, vía lisosoma, vía del estrés del retículo endoplásmico, participación de receptores tipo toll, receptores de muerte, participación mitocondrial y de caspasas. (Martinez J, Torres P, 2013)

5.3.2 Inflamación

Otro papel central en la etiopatogenia de la NASH es la inflamación que es una respuesta fisiológica de protección del organismo, se presenta para controlar las agresiones físicas, químicas o biológicas, y se caracteriza por un elevado número de leucocitos y/o un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en la circulación o en los tejidos. Existe evidencia experimental y clínica que indica que la obesidad induce alteraciones en el tejido adiposo, hepático y muscular que conllevan una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, la cual contribuye a la resistencia a la insulina y a la disfunción metabólica sistémica.(Guitérrez-Rodelo et al., 2017).

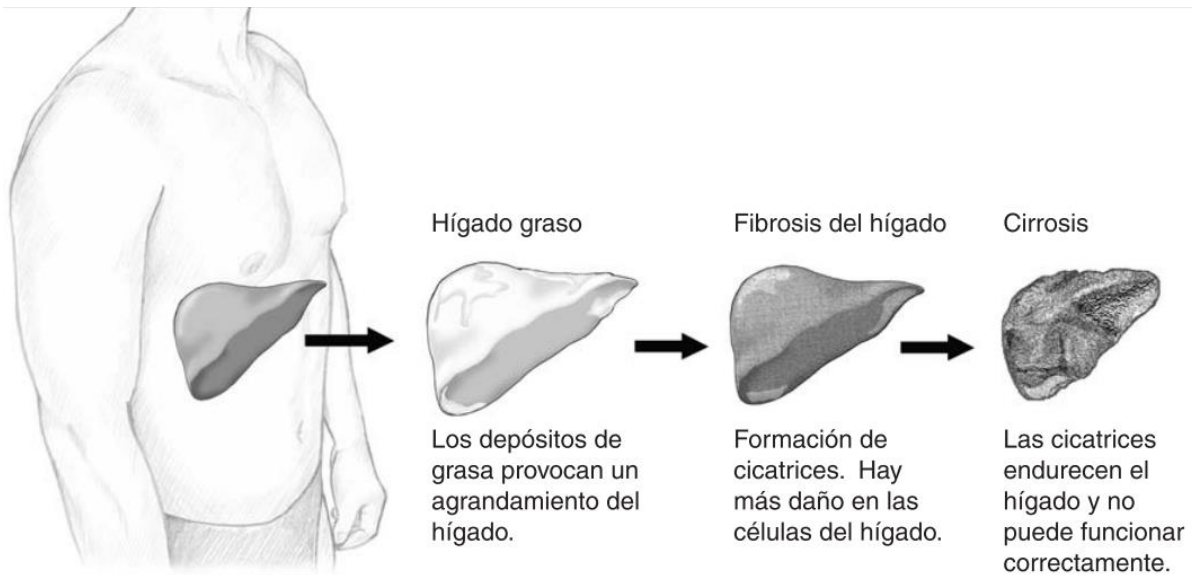
Las diferentes citocinas y adipocitocinas, proinflamatorias o antiinflamatorias, actúan a nivel periférico o hepático modulando la respuesta inflamatoria y la resistencia a la insulina.(Esteve-Lafuente & Ricart-Engel, 2006).

Entre las citocinas proinflamatorias secretadas en el hígado y por macrófagos se incluyen la resistina, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucinas (IL) 6, 18 y 1 β . Estos factores, por una parte, contribuyen al estado local y generalizado de la inflamación asociada a los AG libres. (Guitérrez-Rodelo et al., 2017).

En la NAFLD la inflamación no solo participa en la segunda fase, es decir en la esteatosis, sino que parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de enfermedad hepática severa al favorecer el estrés oxidante y la peroxidación lipídica.

En el hígado, el aumento de las concentraciones de TNFa no sólo juega un papel fundamental en la patogénesis de la esteatosis, sino también en el paso a estadios más avanzados de la NAFLD al mediar en procesos como la inflamación de los hepatocitos, la apoptosis, la necrosis y la fibrosis.

Figura 4: Etapas del daño al hígado (Alvarez-Martínez & Pérez-Campos, 2002).



En resumen, la inflamación participa en todas las fases del daño hepático. El desequilibrio entre las citocinas pro y antiinflamatorias generadas en parte por el aumento de la grasa, especialmente visceral, o por diferentes mecanismos proinflamatorios participará en el deterioro de la sensibilidad a la insulina, tanto periférica, lo que estimula la secreción de AGL, como hepática. Todos estos procesos favorecen el depósito de grasa en el hígado, lo que genera la esteatosis. Posteriormente, la formación de estrés oxidativo en los hepatocitos, que son susceptibles al daño tisular debido a la disfunción que presentan en la homeostasis de la glucosa y los AG, pondrá en marcha los mecanismos inflamatorios que finalmente llevarán al daño celular y a la necrosis. (Esteve-Lafuente & Ricart-Engel, 2006).

5.3.3 Estrés del Retículo endoplásmico

El Retículo endoplásmico (ER), es un organelo celular en donde se realizan importantes funciones celulares, como el almacenamiento del calcio intracelular, el ensamblaje y plegamiento de proteínas y modificaciones postraduccionales. En condiciones de estrés celular, que incrementa la demanda del ER y conlleva una sobrecarga de su capacidad funcional, se generan alteraciones en su función y en la disminución del transporte de proteínas hacia el aparato de Golgi, la expresión de proteínas mal plegadas y la depleción del calcio de este reservorio, que en su conjunto reciben el nombre de estrés del retículo.

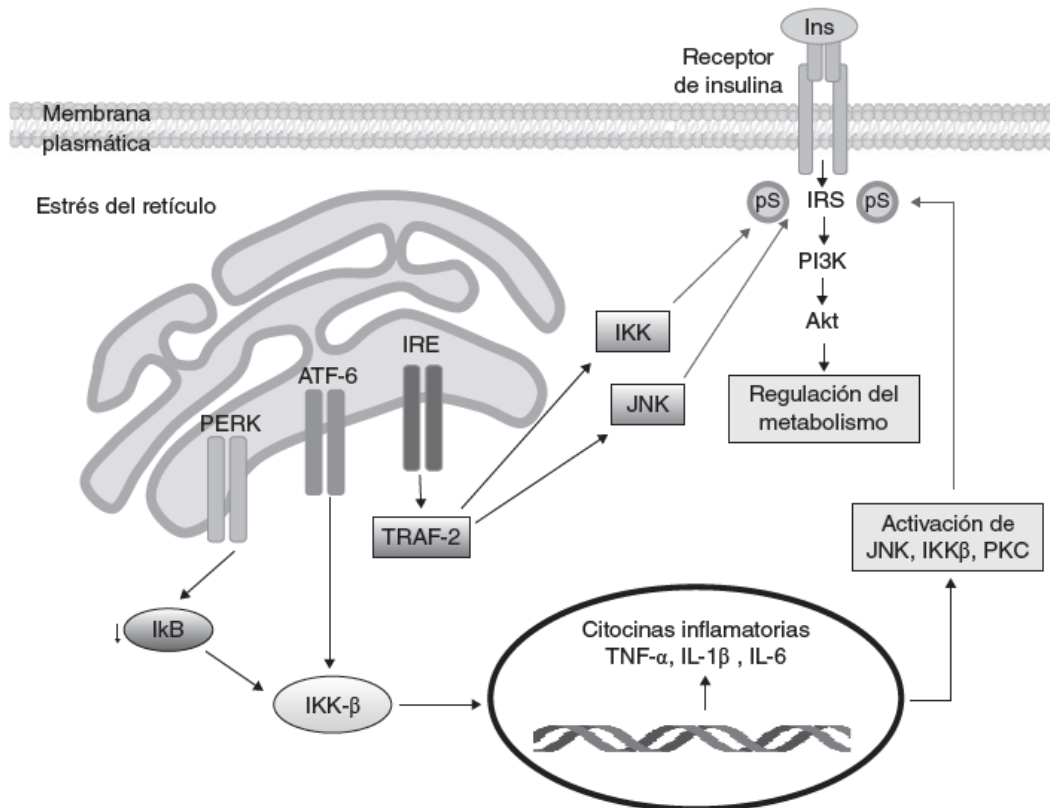
Como mecanismo compensatorio al estrés del ER se activa un mecanismo conocido como UPR (*unfolding protein response*), que permite restablecer la homeostasis de las funciones del ER, mediante la inhibición de la síntesis de proteínas y el aumento tanto de la degradación de las proteínas del ER como del nivel de chaperonas para ayudar en el plegamiento proteico.

La UPR incluye la activación de tres cinasas sensoras de estrés: cinasa de proteína del retículo parecida a la cinasa que se activa por el ARN de doble cadena (PERK), cinasa endorribonucleasa 1 que requiere inositol (IRE-1) y factor activador de la transcripción 6 (ATF-6), las cuales detectan el mal plegamiento proteico y desencadenan la UPR. Entre las respuestas que genera la UPR se encuentra el aumento en el nivel de chaperonas y enzimas de plegamiento que ayudan en el plegado proteico y evitan la agregación de proteínas no plegadas o mal plegadas.

Diversos estudios han demostrado una asociación estrecha entre el estrés del ER, la respuesta inflamatoria. En este contexto, la activación de PERK promueve la activación de NF- κ B, por la supresión de la traducción de su inhibidor de NF- κ B (I κ B), ocasionando su translocación hacia el núcleo, en donde promueve la expresión de una variedad de genes involucrados en vías inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 que activan cinasas de Ser como JNK, IKK- β y PKC- θ .

Por su parte, el ATF-6 también permite la activación del NF- κ B, que, como se ha mencionado, tiene un papel importante en la expresión de citocinas inflamatorias. (Guitérrez-Rodelo et al., 2017)

Figura 5: Estrés del retículo y su asociación con el desarrollo de resistencia a la insulina.



En respuesta al mal plegamiento de proteínas, en el RE se induce la activación de tres cinasas sensoras de estrés: PERK, IRE-1 y ATF-6, las cuales detectan el mal plegamiento proteico y desencadenan un mecanismo conocido como UPR. Estas cinasas también promueven mecanismos que llevan a la síntesis de citocinas inflamatorias o a la activación de cinasas que regulan la activación de IRS. La PERK promueve la liberación de NF- κ B de su inhibidor I κ B, ocasionando su translocación hacia el núcleo y estimulando la síntesis de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Como consecuencia, se activan distintas cinasas de Ser, tales como la JNK y la PKC- θ , lo que conlleva la fosforilación en Ser de IRS-1, que produce resistencia a la insulina. La cinasa IRE-1 fosforila y activa a JNK, la cual su vez fosforila en Ser a IRS-1, efecto que reduce su capacidad para interactuar con otras proteínas de señalización, alterándose principalmente las vías de PI3K/Akt y de MAP cinasas, lo que conlleva resistencia a la insulina. La vía de ATF-6 también activa el NF- κ B, lo que resulta en la misma respuesta proinflamatoria. Las flechas y líneas en gris indican vías de regulación negativa. (Guitérrez-Rodelo et al., 2017).

5.4 Factores de prevención y Desencadenantes de la NAFLD

5.4.1 Dieta mediterránea

La dieta mediterránea (MD) es un patrón alimentario adherido a las personas que viven en la cuenca del mar Mediterráneo. Esta dieta se caracteriza por un alto consumo de verduras, nueces, aceite de oliva y un consumo moderado de vino, junto con el raro consumo de carne roja y procesada, mantequilla y bebidas con azúcar.

La evidencia emergente destaca el efecto protector ejercido por MD se han documentado las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los alimentos, como el aceite de oliva, las nueces, las verduras y el vino.

La característica de MD es el consumo diario de cereales y productos no refinados (p. ej., pan integral, pasta integral y arroz integral), frutas frescas, verduras, nueces, productos lácteos bajos en grasa y aceite de oliva como fuente principal de los lípidos.

La MD también incluye un consumo moderado de pescado, pollo, papas, huevos y un consumo mensual de carne roja. Además de estas características, los científicos nutricionales identifican que los alimentos derivados de plantas (p. Ej., Nueces, aceitunas y frutas) tienen efectos beneficiosos para la salud humana debido a su alto contenido de compuestos bioactivos, AG monoinsaturados y poliinsaturados (PUFA).

Contrariamente al pensamiento común, la MD no es una dieta baja en grasas; las fuentes de lípidos consisten principalmente en alimentos ricos en AG insaturados y antioxidantes (por ejemplo, aceite de oliva, pescado y nueces). La combinación óptima de vitaminas, fitoquímicos y antioxidantes, presentes en los cereales, las frutas y las verduras, también tiene efectos beneficiosos, como preservar el índice

glucémico, reducir los niveles de TG y reducir la oxidación y la inflamación de LDL. (Finicelli et al., 2018)

Los resultados de varios estudios transversales y en perspectiva resaltan el efecto protector ejercido por la adhesión de MD en los diferentes componentes del síndrome metabólico.

Los resultados intrigantes sobre la efectividad de MD para prevenir el síndrome metabólico son los obtenidos en estudios realizados en una población no mediterránea. Un estudio de seguimiento de 7 años realizado en 1,918 participantes de la cohorte de niños de Framingham Heart Study en los Estados Unidos reveló que la adherencia a los patrones de MD redujo la incidencia del síndrome metabólico. En particular, los sujetos con MD mostraron una reducción en las características de síndrome metabólico, como la obesidad abdominal y una mejora en los perfiles de lípidos (Rumawas, Meigs, Dwyer, McKeown, y Jacques, 2009).

5.4.2 Química de los Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son ácidos (AG) orgánicos que se encuentran presentes en la dieta como en las grasas, raramente libres, y casi siempre esterificados al glicerol y eventualmente a otros alcoholes.

Los AG son moléculas anfipáticas que están formadas por cadenas hidrocarbonadas de longitudes diversas, en las que uno de los extremos es un grupo metilo y en el otro extremo opuesto se encuentra un grupo carboxílico, lo cual confiere polaridad a la molécula.

La cadena hidrocarbonada puede contener insaturaciones entre sus átomos de carbono, que le confieren características especiales al AG, como puede ser precursor de biomoléculas activas. (Calvo M.)

Tomando como referencia su estructura química, se pueden clasificar en tres grupos: 'saturados', 'monoinsaturados' y 'poliinsaturados'. Los ácidos grasos

saturados más comunes son el Mirístico (C14:0), Palmítico (C16:0) y Esteárico (C18:0) que están presentes principalmente en alimentos de origen animal.

La mayoría de los ácidos grasos insaturados provienen de las plantas y los pescados. Entre los alimentos que contienen ácidos grasos insaturados se encuentran el aguacate, los frutos secos, los aceites vegetales.

Los AG de especial interés son los llamados ácidos grasos poliinsaturados. Dentro de la familia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), existen dos grupos diferentes: los 'ácidos grasos omega-3' y los 'ácidos grasos omega-6'. Ambos se consideran ácidos grasos esenciales, porque el organismo humano no los puede sintetizar. (Winwood, 2005).

5.4.3 Ácidos Grasos Omega 3

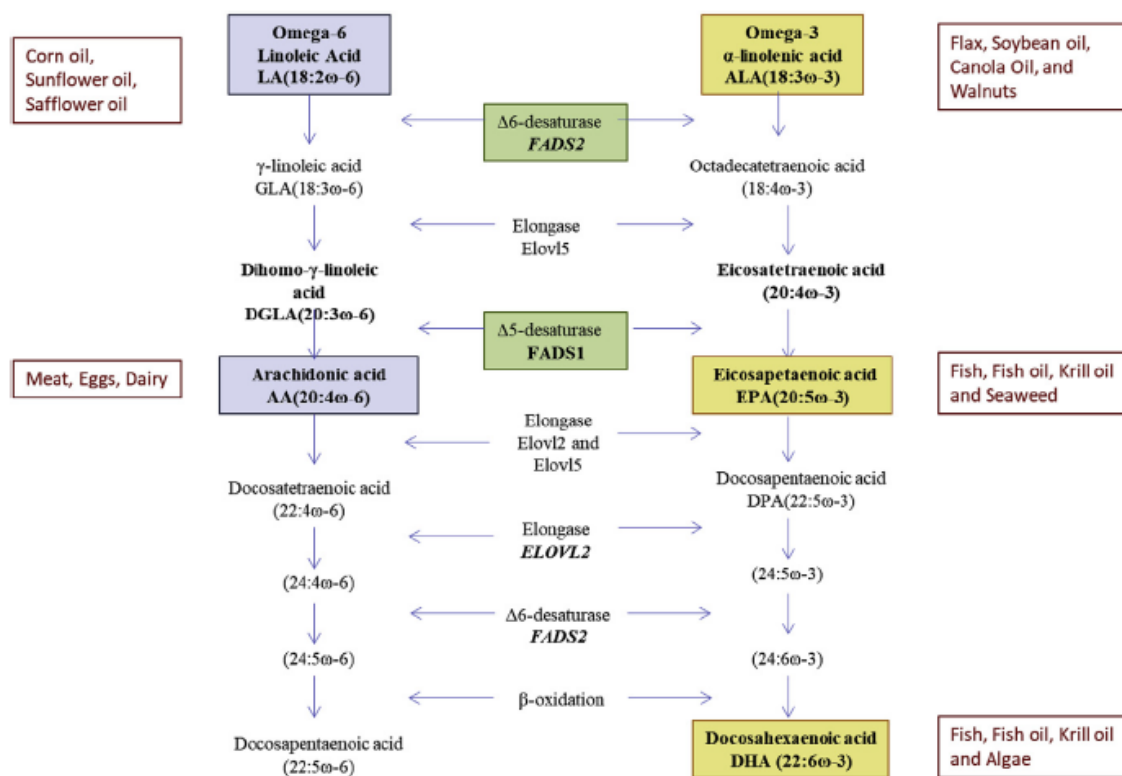
Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 son ácidos grasos de cadena larga caracterizados por la presencia de un doble enlace (C=C) en el tercer átomo de carbono del recuento de cadenas hidrocarboxiladas del extremo metilo (P. C. Calder, 2018).

El ácido α -linolénico es el ácido graso más simple con una cadena hidrocarboxilada de 18 carbonos y tres dobles enlaces. El ácido α -linolénico es uno de los dos "ácidos grasos esenciales" (el otro es el ácido linoleico de la serie omega-6), es decir, no pueden ser sintetizados por animales, incluidos los humanos; por lo tanto, estos ácidos grasos deben obtenerse a través de la dieta. Tanto el ácido α -linolénico como el ácido linoleico se sintetizan en plantas y, por lo tanto, se encuentran en numerosas semillas, nueces y aceites de semillas como las semillas de lino (linaza) y su aceite, aceite de soja, aceite de colza, nueces y aceite de girasol (Philip C. Calder & Yaqoob, 2009).

Normalmente, las semillas de lino contienen 45-55% de ácidos grasos como ácido α -linolénico mientras que el girasol, el aceite es altamente rico en ácido linoleico de ácido eicosapentaenoico [EPA; 20: 5 (ω -3)], ácido docosapentaenoico [DPA; 22: 5 (ω -3)], y ácido docosahexaenoico [DHA; 22: 6 (ω -3)], que son funcionalmente los ácidos

grasos omega-3 altamente insaturados de cadena muy larga más importantes (Scorletti & Byrne, 2018).

Figura 6: El ácido linoleico y el ácido α -linoleico se convierten en ácidos grasos poliinsaturados.



El ácido linoleico y el ácido α -linoleico se convierten en ácidos grasos poliinsaturados por enzimas elongasa y desaturasa enzimáticas. Los ácidos grasos esenciales se encuentran en semillas y aceites vegetales; mientras que los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en el pescado, aceite de pescado, algas, carne y huevos. (Scorletti & Byrne, 2018)

Aunque estos ácidos grasos de cadena muy larga se encuentran en una variedad de alimentos, el pescado (especialmente el aceite de pescado) y otros mariscos son las fuentes más ricas de EPA, DPA y DHA. El ácido α -linoléico es el precursor de la serie de ácidos grasos omega-3 de cadena larga y la ingesta diaria recomendada es de 1.6 g / día para los hombres y 1.1 g / día para las mujeres ($\geq 0.5\%$ de grasa total) (P. C. Calder, 2018).

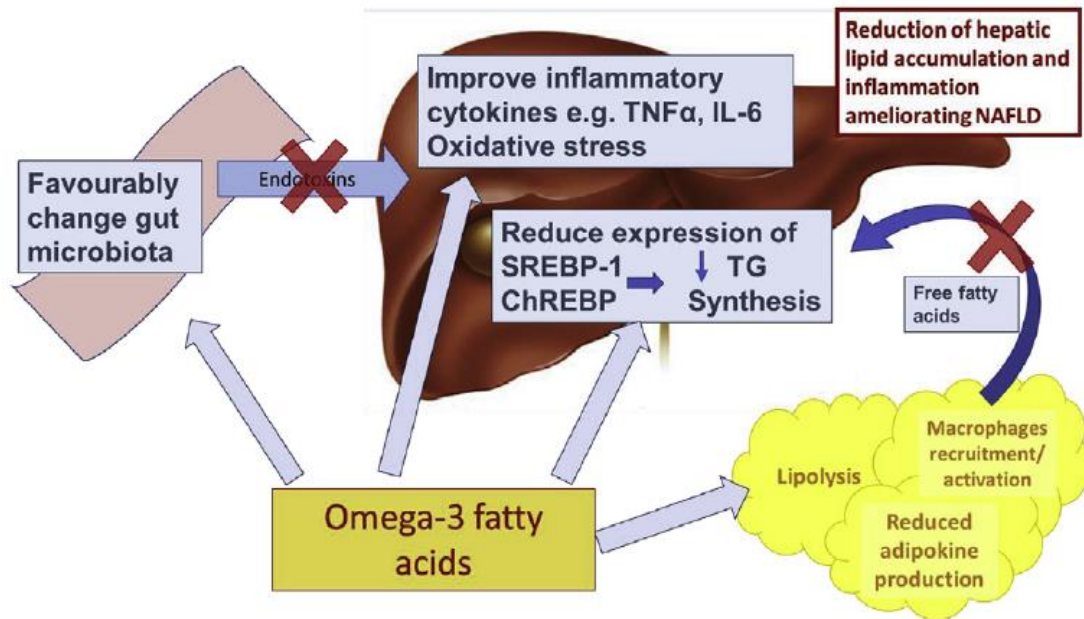
Con respecto a EPA y DHA, una ingesta adecuada varía entre 0,25 y 2 g / día (lo que corresponde a dos porciones de pescado por semana, con al menos una porción de aceite de pescado) (Smit et al., 2009).

Con una dieta saludable, la proporción fisiológica entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 debe ser 4: 1. Considerando que, en la dieta occidental, el consumo de ácido linoleico para la serie omega-6 es 5-20 veces mayor que el consumo de ácido α -linolénico. En presencia de un equilibrio fisiológico, las enzimas desaturasas y elongasas exhiben una mayor afinidad por metabolizar los ácidos grasos omega-3 (Smit et al., 2009).

Teniendo en cuenta su impacto beneficioso en los grupos cardiometabólicos (hipertensión, hiperlipidemia, disfunción endotelial y aterosclerosis), los Omega 3 están surgiendo como un posible tratamiento de la esteatosis hepática, especialmente el EPA y el DHA, al regular los factores de transcripción génica (es decir, PPAR α , PPAR γ , SREBP-1, ChREBP), pueden controlar vías clave involucradas en el metabolismo lipídico hepático. Con más detalle, los Omega 3 son potentes activadores de PPAR α , que regulan positivamente varios genes involucrados en la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y regulan negativamente los genes proinflamatorios, como el TNF- α y la IL-6. Por otra parte, los Omega 3 activan PPAR γ , que resulta en un aumento de la oxidación de las grasas y mejora la sensibilidad a la insulina.

Además de mejorar la oxidación beta hepática, los Omega 3 también pueden disminuir la producción de lípidos endógenos al inhibir la expresión y el procesamiento de SREBP-1, que, en respuesta al aumento de los niveles de glucosa e insulina, estimula la transcripción de varios genes lipogénicos y glicolíticos. Además, estos Omega 3 pueden inhibir la glucólisis hepática y la lipogénesis y suprimen la actividad de ChREBP, otro regulador glicolítico y de genes lipogénicos, como la L-piruvato quinasa y la sintasa de ácidos grasos. (Di Minno et al., 2012)

Figura 7: Mecanismo benéfico del Omega 3



Mecanismos potencialmente responsables del efecto benéfico del tratamiento con ácidos grasos omega-3 en NAFLD. (Scorletti & Byrne, 2018)

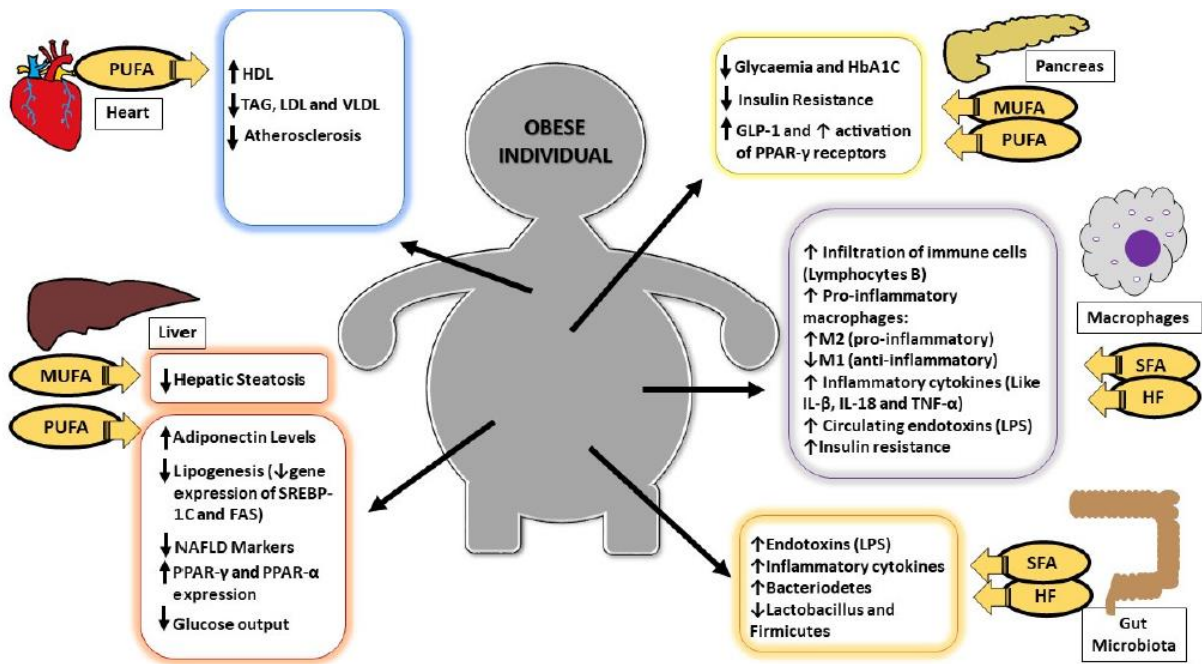
5.4.4 Ácidos Saturados

Por el contrario, el consumo excesivo de AGS puede ser un factor de riesgo para la patogénesis de la NAFLD (Figueiredo et al., 2017); ya que los AGS son dispensables en la dieta, puesto que el organismo los puede sintetizar.

Entre los más abundantes en la alimentación destacan el ácido palmítico, el cual se ha demostrado in vitro que activa la inflamación en el desarrollo de NAFLD. (Figueiredo et al., 2017).

También el ácido esteárico, el láurico y el mirístico se les ha atribuido un efecto proinflamatorio, este tipo de AG lo encontramos principalmente en grasas animales, lácteos e incluso en algunos aceites tropicales como es el aceite de coco y de palma. (FAO,2008).

Figura 8: Diferentes cambios metabólicos implicados después del consumo de diferentes tipos de ácidos grasos.



Los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA). Los diferentes tipos de ácidos grasos tienen diferentes efectos en los principales órganos metabólicos del cuerpo. Las dietas con niveles altos de SFA, especialmente de alto contenido de grasa (HF), modulan el proceso inflamatorio con la infiltración de macrófagos y otros tipos inmunológicos de mayor producción de macrófagos tipo M2, considerados proinflamatorios, con una reducción de los macrófagos tipo M1, que son antiinflamatorios. Por otro lado, el consumo de MUFA y PUFA tiene efectos positivos sobre el metabolismo de la glucosa, con una reducción de algunos parámetros relacionados con el tipo II diabetes mellitus (DM II), como la hemoglobina A1c (HbA1c) y la glucemia, y una reducción de la esteatosis hepática y los parámetros relacionados. La ingesta de PUFA está relacionada con una mayor expresión de adiponectina, una citoquina antiinflamatoria, que promueve el aumento del metabolismo hepático y reduce el riesgo de aterosclerosis, como el aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la disminución de triacilglicérols (TAG). LDL; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); receptor de péptido-1 similar al glucagón (GLP-1); Receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR); ácidos grasos libres (FFA); proteína de unión al elemento regulador de colesterol -1C (SREBP-1C); Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); interleucina (IL); factor de necrosis tumoral (TNF); lipopolisacárido (LPS); alto contenido de grasa (HF). (Figueiredo et al., 2017)

En otro informe, se estudiaron los efectos de las dietas altas en grasa con diferentes concentraciones de ácido palmítico y ácido oleico sobre el metabolismo de adultos obesos durante tres semanas de tratamiento. Hubo una dieta con alto contenido de ácido palmítico (HPA) y moderada en ácido oleico (OA) (grasa, 40.4% kcal; PA, 16.0% kcal; OA, 16.2% kcal), y una dieta baja en PA y alta en OA (HOA) (grasa, 40.1% kcal; PA, 2.4% kcal; OA, 28.8% kcal). La dieta HPA resultó en una disminución en IL-1B, un marcador inflamatorio, cuando se comparó con la dieta control con 15.9% de OA. Esta dieta también resultó en una disminución en los niveles de TNF-alfa, IL-18 e IL-10.

6. Metodología experimental

6.1 Alimentación a ratones de la cepa BALB/c a Esteatosis

Se utilizaron un total de 8 ratones macho de la cepa BALB/c, los cuales fueron separados en dos grupos, el primer grupo tuvieron la dieta chow (que contiene 4% de grasa) y el segundo grupo tuvieron la dieta western (que contiene 23% de grasa), ambos grupos tuvieron acceso libre a la comida y agua por una semana en un ciclo regular de luz-oscuridad (12h / 12h).

6.2 Obtención de Cultivos Primarios

Para la obtención de los cultivos primarios los ratones fueron anestesiado por inyección intraperitoneal de 0.60 ml de Tribromoetanol por cada 25 g de peso corporal.

Los hepatocitos primarios fueron aislados por el método de perfusión de colagenasas, se cultivó en medio que contiene 10% de SFB y 23 mM HEPES.

Las células fueron divididas de acuerdo a las dietas dadas a los ratones (Chow y Western). A su vez, cada uno de estos 2 grupos celulares fueron subdivididos en tres tratamientos: Control, MED y SAT.

6.3 Preparación del complejo de albúmina y ácido graso

Los ácidos grasos (Palmítico, Mirístico, Oleico y Omega 3 (DHA: EPA, 3:7)) fueron disueltos en alcohol etílico a una concentración de reserva de 100 mM cada uno.

De estos ácidos grasos se prepararon dos mezclas con diferente proporción, simulando la concentración presente en el plasma sanguíneo de personas que tienen una dieta alta de ácidos grasos saturados y una dieta alta de ácidos grasos mono y poliinsaturados.

Alta en Saturados (SAT)

- Acido Palmítico 67%
- Ácido Mirístico 3%
- Ácido Oleico 23%
- Omega 3 (EPA: DHA, 7:3) 6.5%

Alta en Mono y Poliinsaturados (MED)

- Acido Palmítico 57%
- Mirístico 0.5%
- Ácido Oleico 27%
- Omega 3 (EPA: DHA, 7:3) 14.5%

Cada una de estas mezclas se conjugaron con albúmina de suero bovino (25 mg/mL) para asegurar que las mezclas de estos ácidos grasos puedan entrar con mayor eficacia dentro del hepatocito. La conjugación se realiza en el termo agitador a 40°C a 600 rpm toda la noche.

6.4 Estimulación de los Hepatocitos primarios con la mezcla de ácidos grasos

Los hepatocitos fueron divididos de acuerdo a la dieta dada, el primer grupo dieta chow y el segundo grupo con la dieta western. A su vez, cada uno de estos 2 grupos celulares fueron subdivididos en tres tratamientos: Control, MED y SAT.

Se estimuló con los tratamientos por 24 horas, la incubación fue con medio de cultivo Williamson junto con los ácidos grasos. La incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 24 horas.

6.5 Técnica de Rojo Oleoso

La acumulación de lípidos en las células se observó mediante la tinción de rojo oleoso. Brevemente, las células se cultivaron en cajas Petri. Después de 24 horas de tratamiento, las células se lavaron tres veces con solución buffer de fosfato salino (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de eliminar el paraformaldehído, las células se lavaron con isopropanol 60% y luego se incubaron con la solución de Rojo Oleoso por 10 minutos. La placa se lavó 5 veces con agua y se montaron en solución de glicerol/PBS (1:1) y las imágenes fueron observadas con un microscopio de luz vertical ZEISS Axioscope (Axioscope 5, Carl Zeiss) a 400X.

6.5 Extracción de proteínas

Veinticuatro horas después de la estimulación se descartó el de cada caja Petri y se adicionó solución salina (PBS) con inhibidores de proteasas (Complete Tablets EASY pack protease Inhibitor Cocktail Tablets by ROCHE) (3 mL por caja) y se realizó un raspado de las cajas de petri utilizando un escalpelo para obtener las células.

Una vez obtenidas las células fueron almacenadas en tubos Falcón de 10 mL rotulados de acuerdo a la dieta y al tratamiento de cada ratón.

La solución con células se centrifugó (SORVALL® LEGEND RT) a 3000 RPM por 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el pellet, este pellet se resuspendió en 400 mcL de Buffer de lisis RIPA y fueron trasbasados a tubos Eppendorf de 1.5 mL para ser sonicados a una amplitud del 80% en intervalos de 10 segundos por muestra.

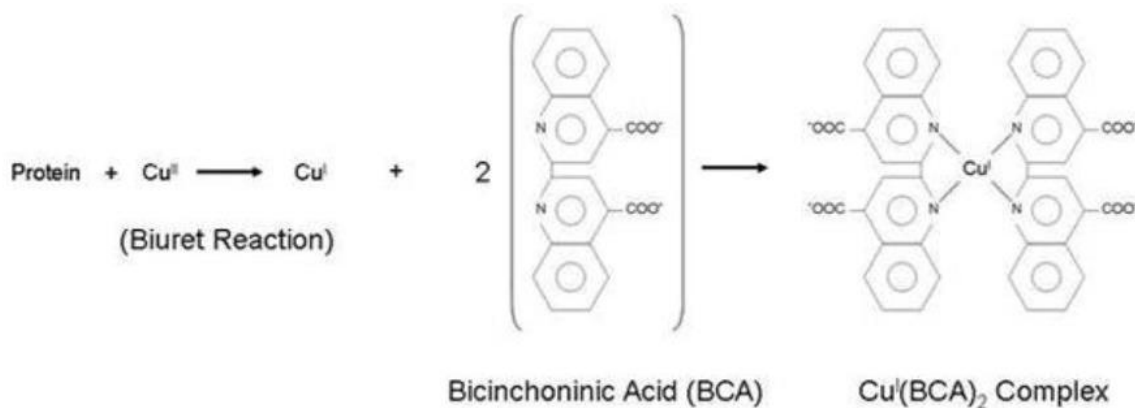
La solución de lisis celular se centrifugó en microcentrífuga (SORVALL® fresco) a 13,000 RPM por 15 minutos a 4°C, finalizando se obtuvo el sobrenadante el cual se transfirió en tubos Eppendorf de 0.6 mL previamente etiquetados.

6.6 Cuantificación de las proteínas

Las muestras proteicas fueron cuantificadas por curva de calibración directa mediante espectrofotometría a través del espectrofotómetro multidetector (BECKMAN COULTER). Para ello las muestras proteicas fueron tratadas conforme lo especifica el protocolo del Kit Pierce™ BCA Protein Assay para placas de 96 pozos.

Este kit se fundamenta en el uso del ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{+1} . El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Bio-l, n.d.)

Figura 9: Formación del complejo Cu-BCA.



6.7 Expresión de proteínas por Western Blot

Se realizaron alícuotas de 20 uL que contenían 100 ug de proteína y buffer de carga 2X (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, glicerol, SDS al 10% y azul de bromofenol), se calentó durante 5 minutos a 90 °C en el termo-shaker (TS-100 bioSan), pasando el tiempo se resguardaron a 4 °C.

Se preparó geles de poliacrilamida para electroforesis SDS-PAGE, con un porcentaje del 5% para el gel concentrador y con un porcentaje del 12.5% para el gel separador, se corrió en cámara electroforética vertical (Mini-PROTEAN® Tetra System, BIO-RAD) a 120 V durante 2 horas.

6.8 Transferencia

La transferencia se llevó a cabo por transferencia semi seca en un equipo (TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD) a membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilon®-P Transfer Membrane, Merck Millipore) La transferencia se llevó a cabo a 65 mA (por membrana) durante 2 horas.

La transferencia de los geles se reveló con azul de coomassie (InstantBlue™ Coomassie Protein Stain, expedeon) para confirmar la carga de proteína igual en los diferentes carriles.

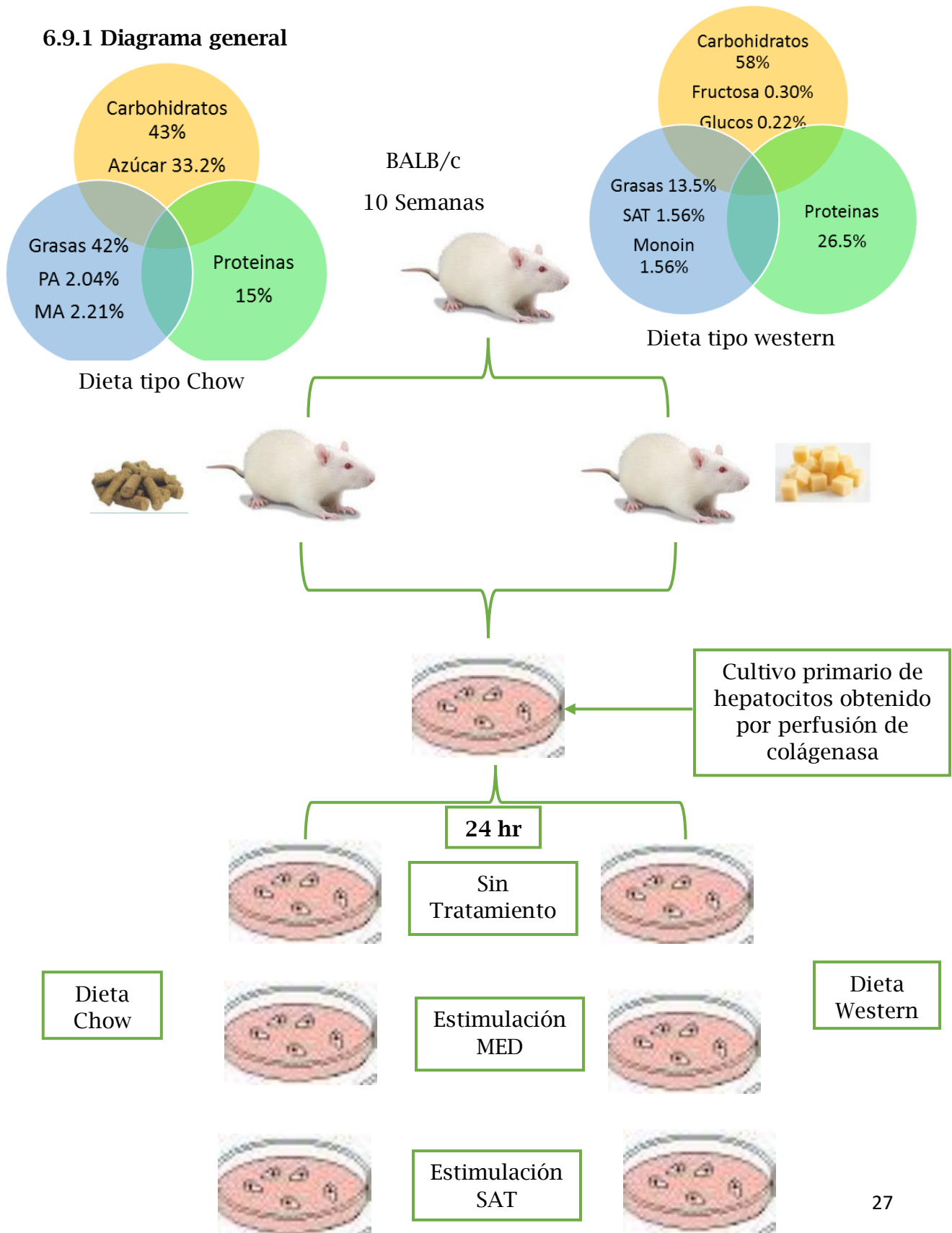
Las membranas fueron bloqueadas en solución TBS-Tween 20 al 0.05% con leche desgrasada al 5% durante 1 hora. Las membranas se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios en las diluciones apropiadas (Ver Anexo A) en solución TBS-Tween 20 al 0.05% durante la noche en refrigeración a 4 °C.

Posteriormente, se realizaron 2 lavados con solución TBS-Tween 20 al 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios, en las diluciones apropiadas, en solución TBS-Tween 20 al 0.05% durante 1 hora a 25 °C.

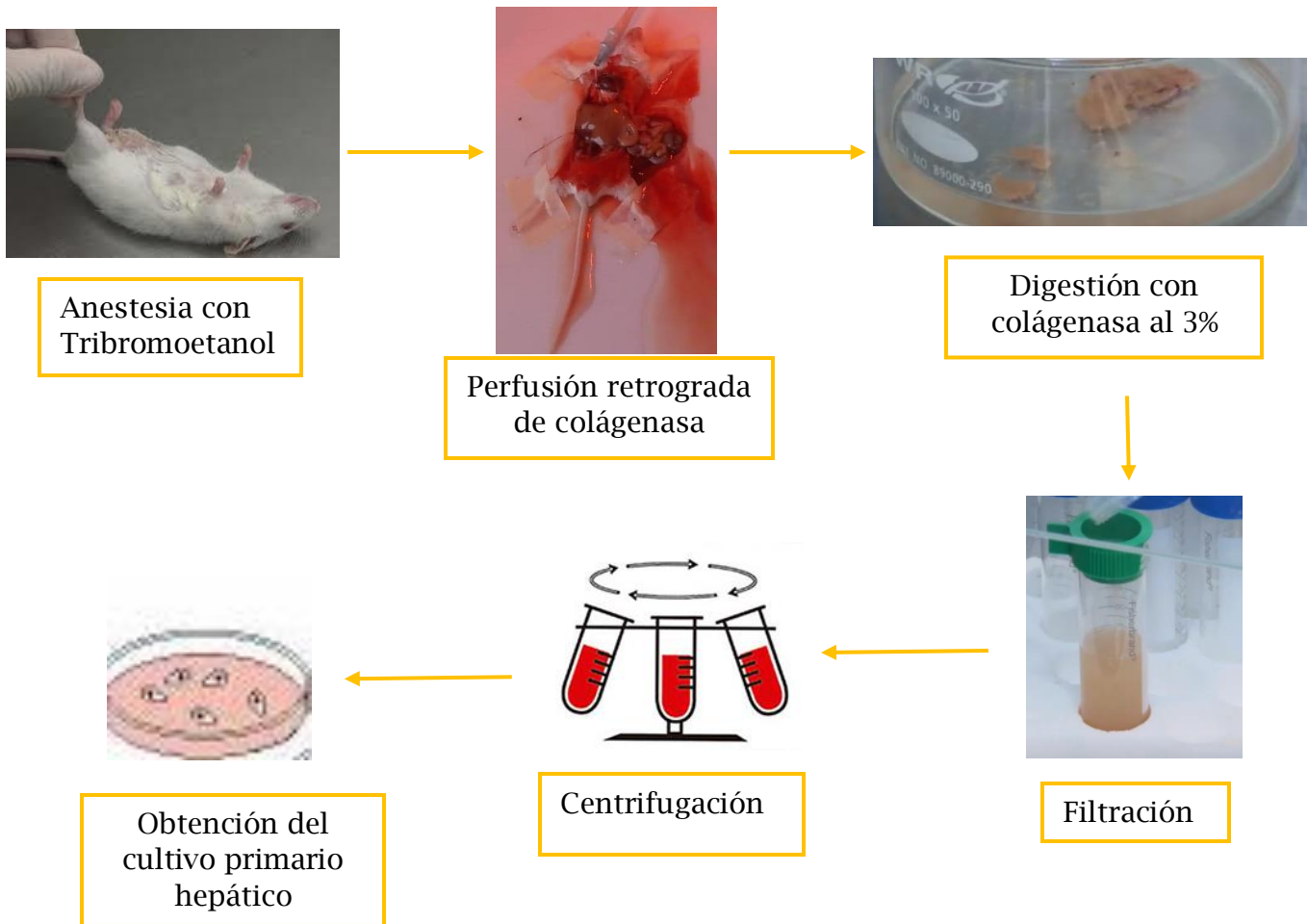
Para revelar, se realizaron 3 lavados con solución TBS-Tween 20 al 0.1% y se adicionó la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Luminata™ Forte Western HRP Substrate) La visualización se hizo mediante quimioluminiscencia usando el fotodocumentador (ChemiDoc™ MP, BIO-RAD).

6.9 Diagrama de diseño del estudio

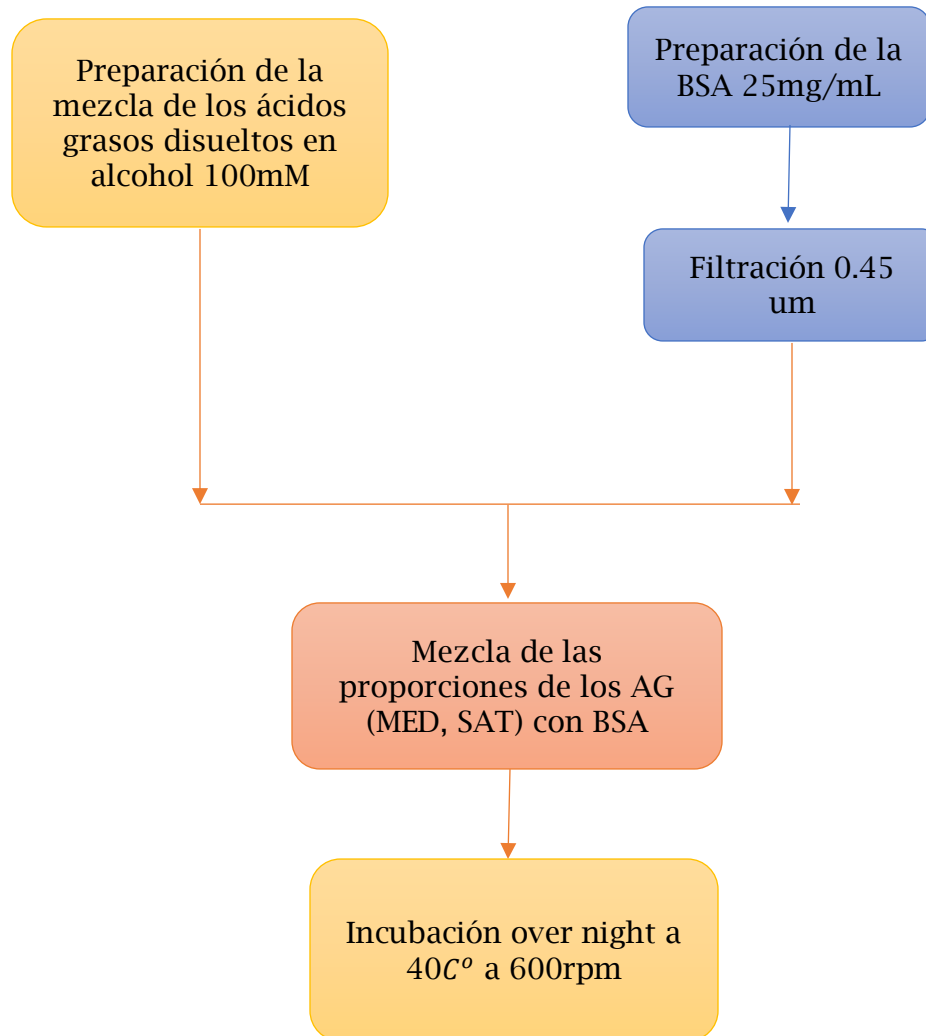
6.9.1 Diagrama general



6.9.2 Diagrama de obtención del cultivo primario hepático



6.9.3 Diagrama de tratamientos



Dieta Chow

Dieta Western



ST



MED

- Ácido palmítico 57%
- Ácido mirístico 0.5%
- Ácido oleico 27%
- Omega 3(EPA:DHA, 7:3) 14.5%

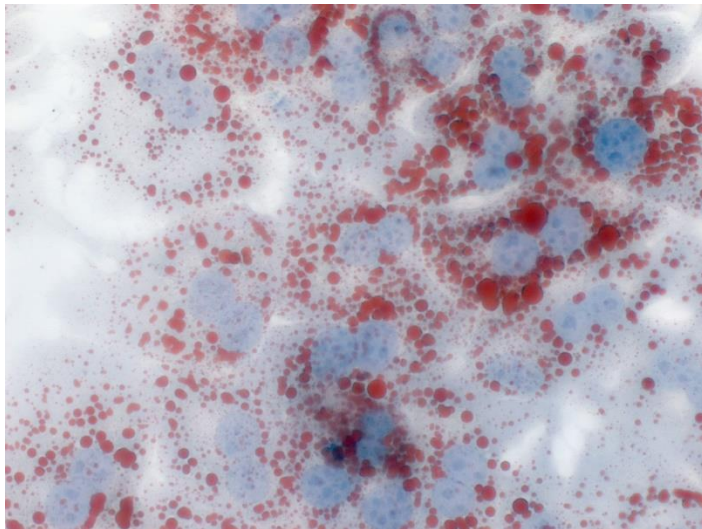
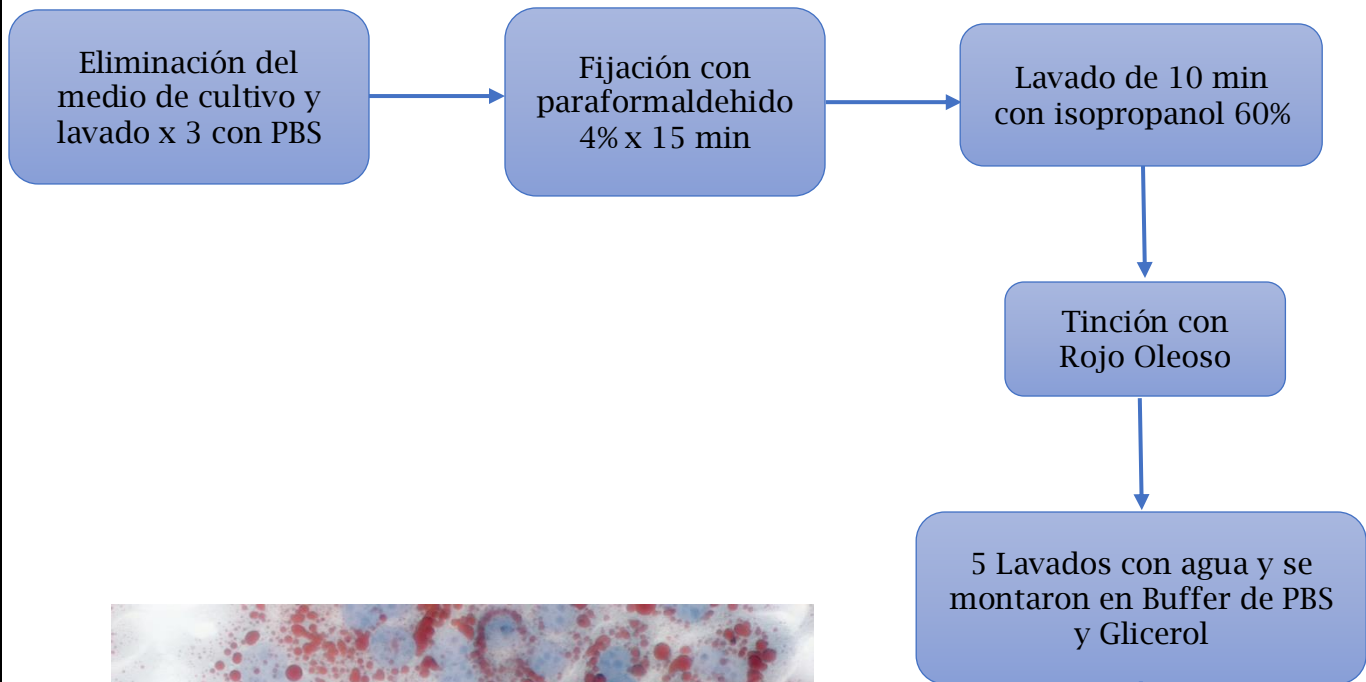


SAT

- Ácido palmítico 67%
- Ácido mirístico 3%
- Ácido oleico 23%
- Omega 3(EPA:DHA, 7:3) 6.5%

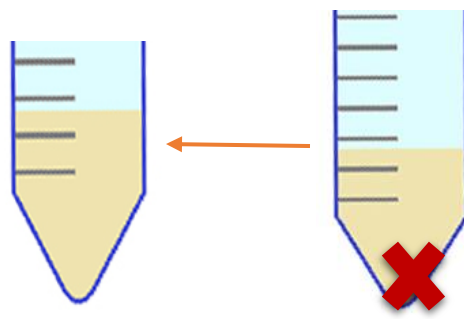
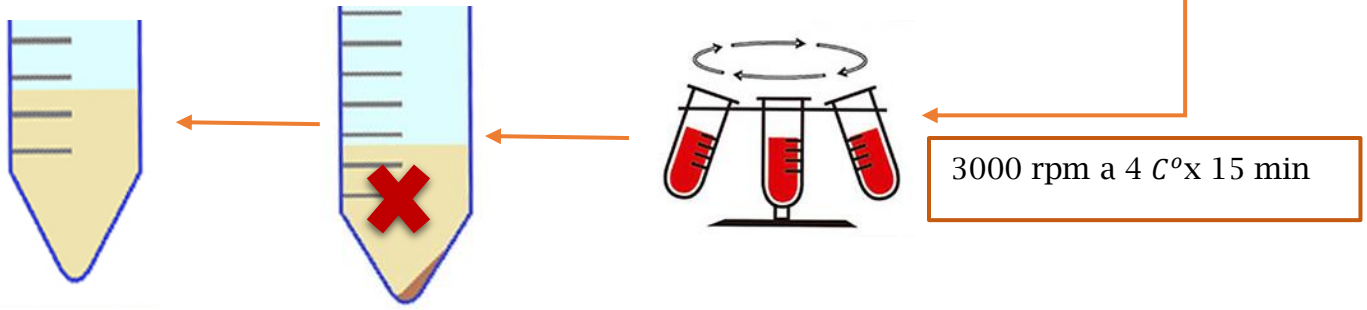
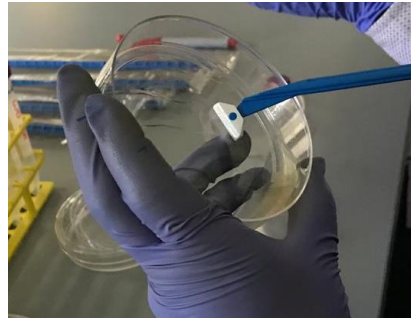


6.9.3 Diagrama de tinción con rojo oleoso

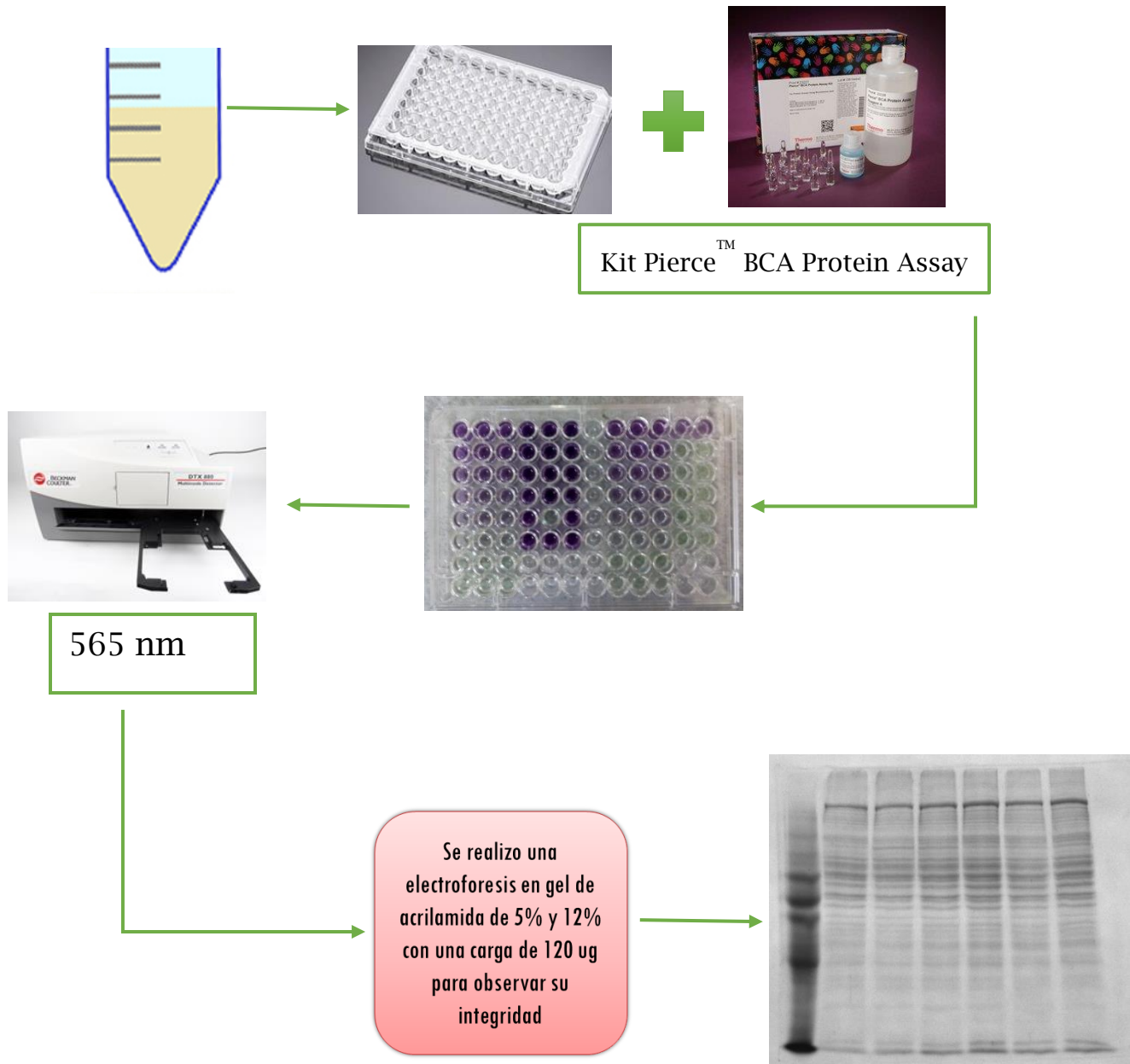


Acumulación de TG en cultivo primario hepático de ratón

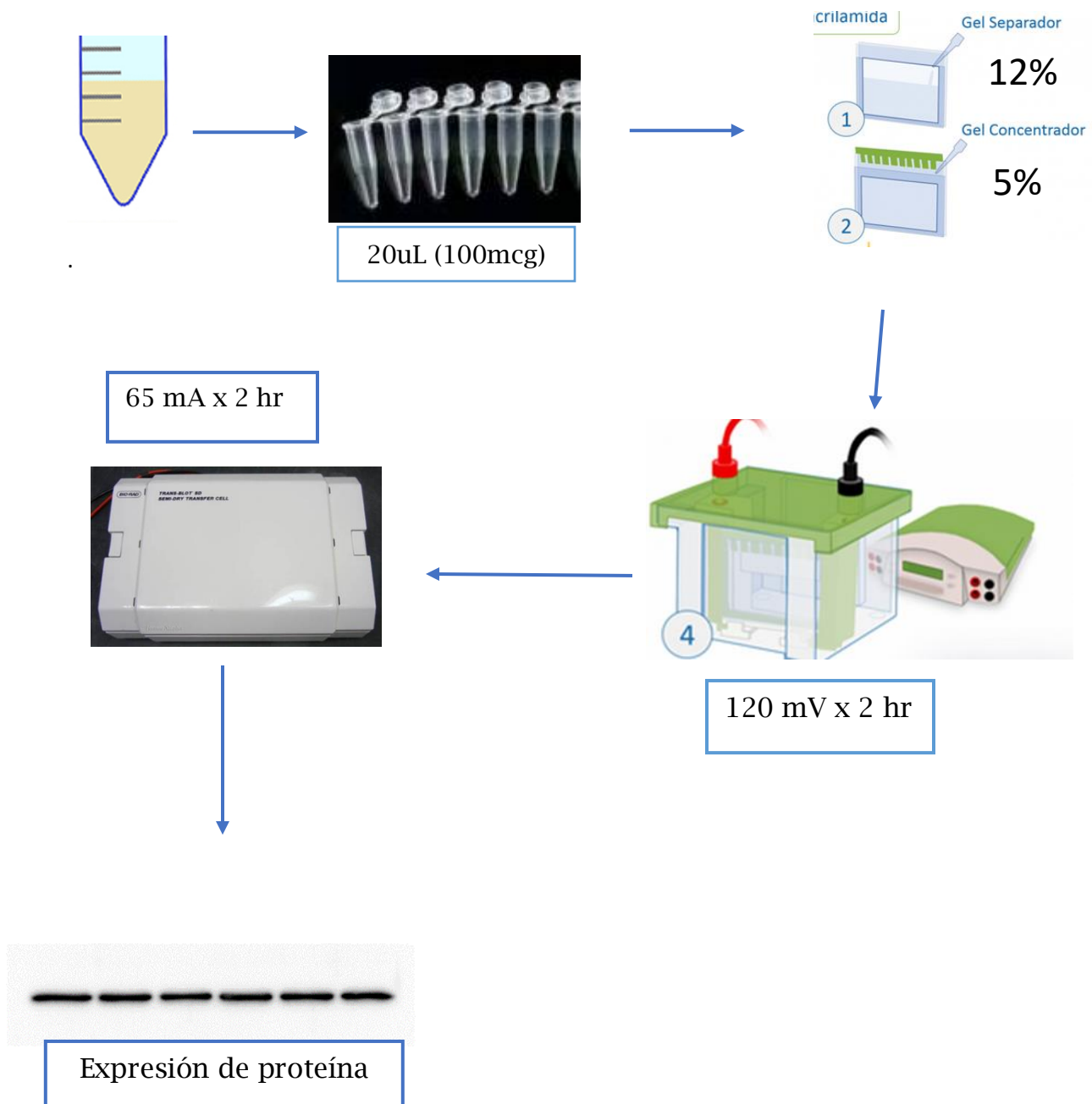
6.9.4 Diagrama de extracción de proteínas



6.9.5 Diagrama Cuantificación de Proteínas



6.9.6 Diagrama de expresión de proteínas por western blot

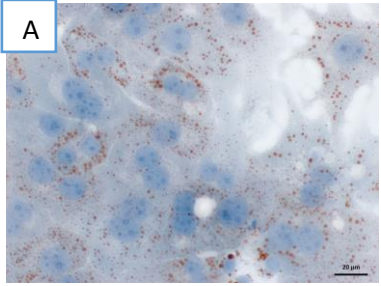
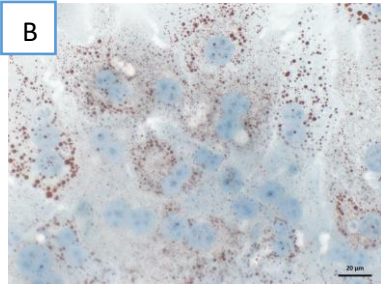
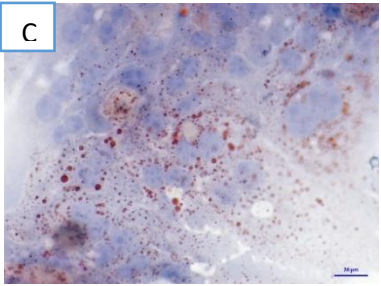
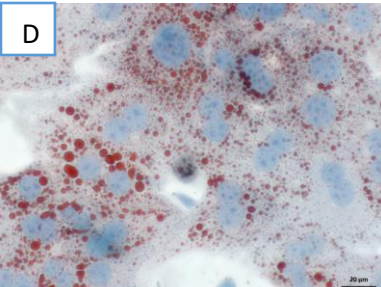
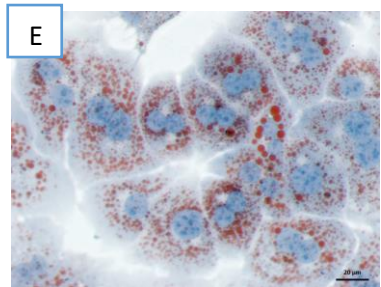
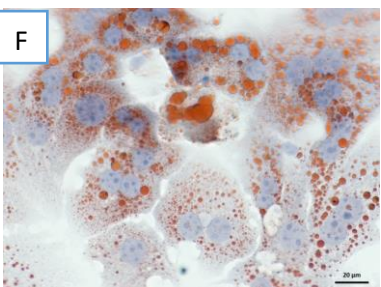


7. Resultados

7.1 Tinción con Rojo Oleoso

Para observar la condición del estado del hepatocito tras lo tratamientos de los AG se realizó la tinción de rojo oleoso, cuya función es la de teñir los ácidos grasos de color rojo, mientras que los núcleos celulares son contra teñidos en azul. Así de este modo se puede observar la acumulación de AG dentro del hepatocito

Tabla 1 Efecto de los tratamientos de AG en cultivo primario hepático

	ST	MED	SAT
DIETA CHOW			
DIETA WESTERN			

Efecto de las mezclas de ácidos grasos en hepatocitos esteatóticos. A) Hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Chow por 7 días, D) Hepatocitos de ratones con dieta Western por 7 días, B) E) Hepatocitos estimulados por la mezcla alta en ácidos grasos mono y poliinsaturados y baja en saturados (MED) por 24 hrs, C) F) Hepatocitos estimulados con mezcla alta en ácidos grasos saturados y baja en mono y poliinsaturados (SAT) por 24 hrs. Las imágenes son representativas de al menos 3 de 4 animales. La barra de referencia fueron 500 μm (400x magnificación).

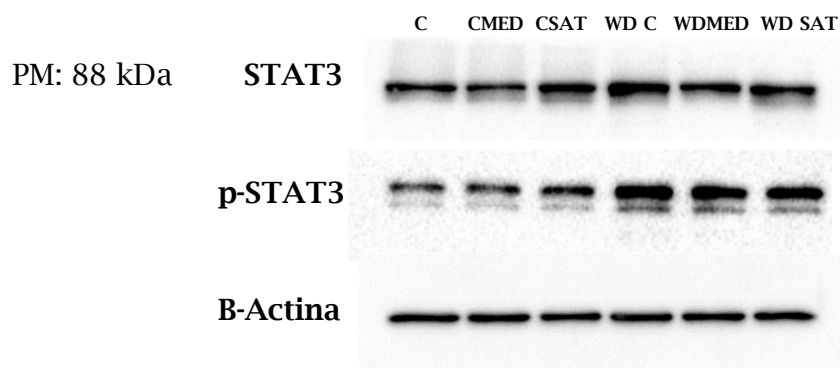
7.2 Western blots

Para observar los cambios de las rutas de señalización celular de las vías de la inflamación y del estrés del retículo endoplásmico se realizaron western blot de proteínas correspondientes a cada vía.

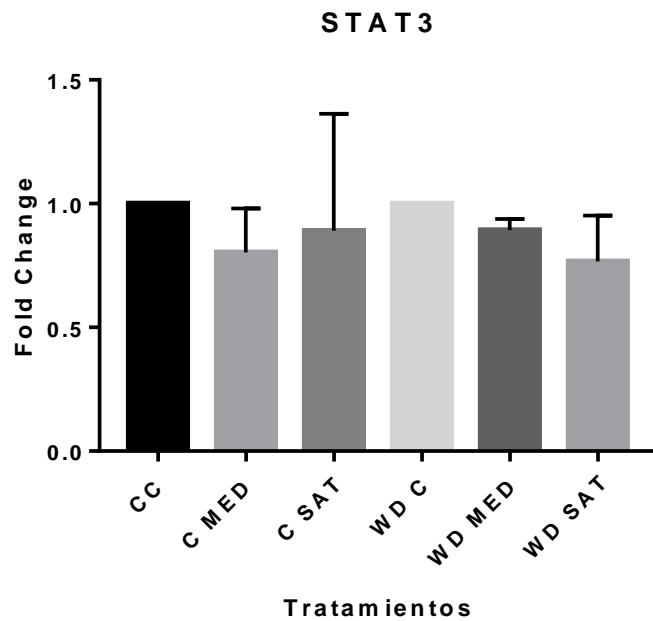
7.2.1 Proteínas de la Señalización inflamatoria

Las gráficas representan el cambio fold change que es una medida que describe cuánto cambia una cantidad al pasar de un valor inicial a un valor final; en este experimento representa que tanto se sobre activa o se inhiben las proteínas de cada vía de señalización.

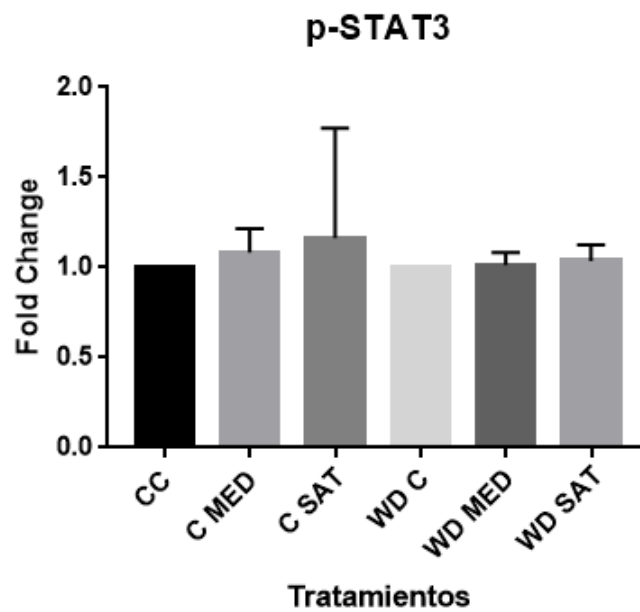
Figura 10: Western blots para STAT3 y p-STAT3



Expresión de proteínas inflamatorias y B-Actina, proteína housekeeping. Los grupos de tratamiento incluyeron una dieta control con mezcla de los AG MED y SAT n=6 y una dieta western con mezcla de los AG MED y SAT n=6, el análisis de las imágenes fue por Image J y el análisis estadístico con Graph Pad Prism versión 7, con una P=0.05

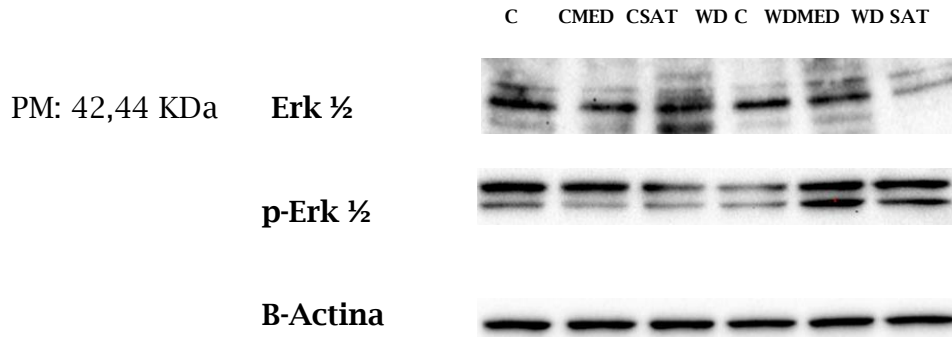


Grafica 1: Fold Change de la expresión relativa de las proteínas de STAT3

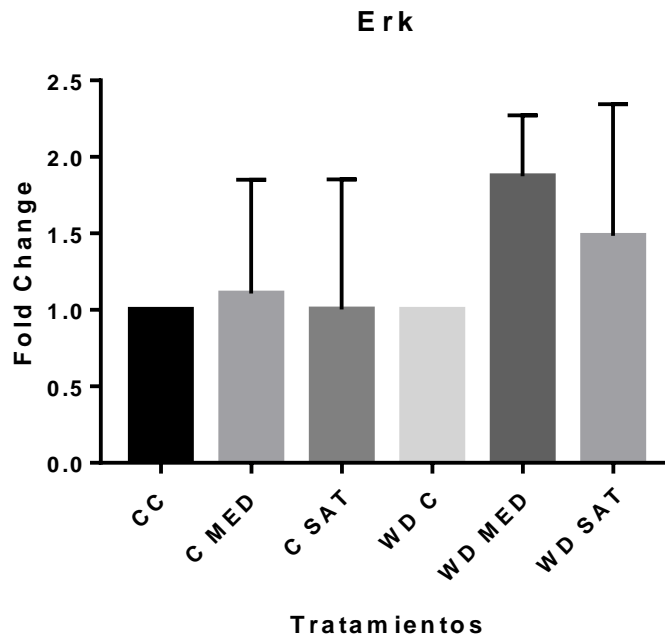


Grafica 2: Fold Change de la expresión relativa de las proteínas de p-STAT3

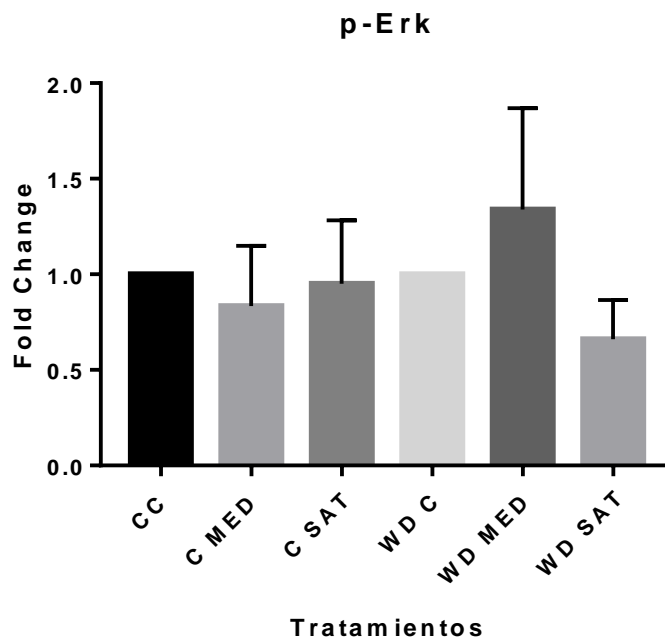
Figura 11: Western blots para Erk ½ y p-Erk ½-



Expresión de proteínas inflamatorias y B-Actina, proteína housekeeping. Los grupos de tratamiento incluyeron una dieta control con mezcla de los AG MED y SAT n=6 y una dieta western con mezcla de los AG MED y SAT n=6, el análisis de las imágenes fue por Image J y el análisis estadístico con Graph Pad Prism versión 7, con una P=0.05

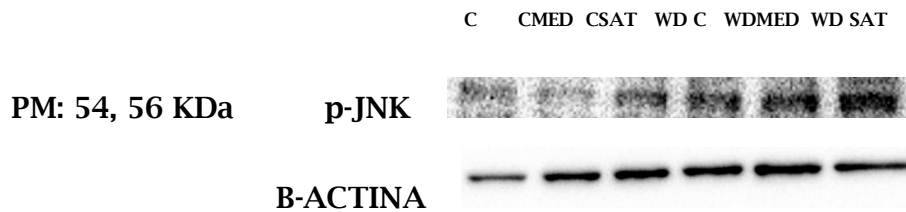


Gráfica 3: Fold Change de la expresión de las proteínas de Erk ½

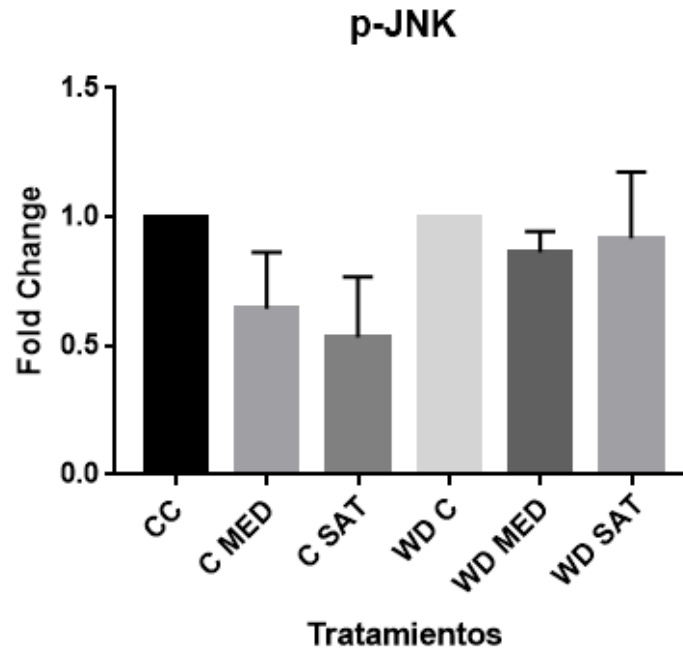


Grafica 4: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-Erk ½

Figura 12: Western blots para p-JNK



Expresión de proteínas inflamatorias y B-Actina, proteína housekeeping. Los grupos de tratamiento incluyeron una dieta control con mezcla de los AG MED y SAT n=6 y una dieta western con mezcla de los AG MED y SAT n=6, el análisis de las imágenes fue por Image J y el análisis estadístico con Graph Pad Prism versión 7, con una P=0.05

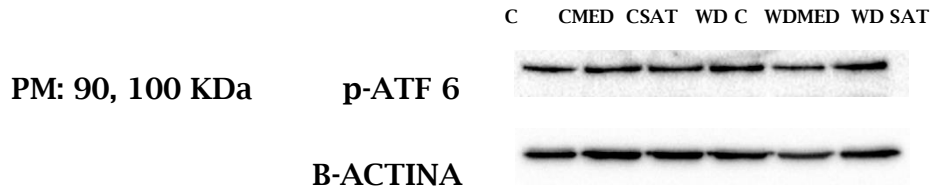


Grafica 5: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-JNK

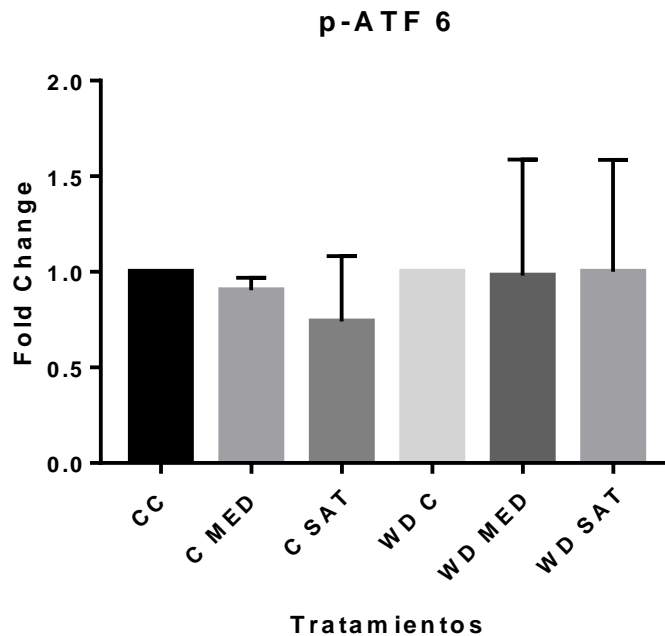
En relación de las tres proteínas presentes en la señalización inflamatoria no se encuentran diferencias significativas estadísticamente hablando, lo único que se puede reportar es una ligera activación en todos los hepatocitos que provienen de la dieta western.

7.2.1 Proteínas de la Señalización del Estrés del Retículo endoplasmático

Figura 13: Western blots para p-ATF 6

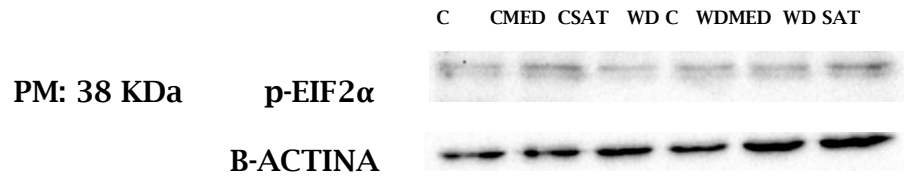


Expresión de proteínas del estrés del retículo endoplásmico y B-Actina, proteína housekeeping. Los grupos de tratamiento incluyeron una dieta control con mezcla de los AG MED y SAT n=6 y una dieta western con mezcla de los AG MED y SAT n=6, el análisis de las imágenes fue por Image J y el análisis estadístico con Graph Pad Prism versión 7, con una P=0.05

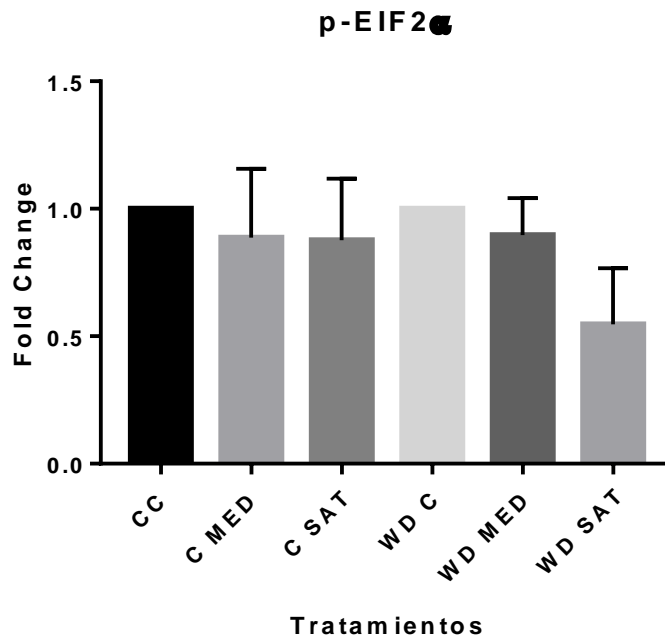


Grafica 6: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-ATF 6

Figura 14: Western blots para p-EIF2 α



Expresión de proteínas del estrés del retículo endoplásmico y B-Actina, proteína housekeeping. Los grupos de tratamiento incluyeron una dieta control con mezcla de los AG MED y SAT n=6 y una dieta western con mezcla de los AG MED y SAT n=6, el análisis de las imágenes fue por Image J y el análisis estadístico con Graph Pad Prism versión 7, con una P=0.05



Grafica 7: Fold Change de la expresión de las proteínas de p-EIF2 α

En relación de las dos proteínas presentes en la señalización del estrés del retículo endoplásmico no se encuentran diferencias significativas estadísticamente hablando, lo único que se puede reportar es una ligera activación en los hepatocitos que provienen de la dieta western en el caso de ATF6, sin embargo, en el caso de p-EIF2 α se reporta una disminución en la activación de los hepatocitos que provienen de la dieta western con el tratamiento SAT.

8. Discusión

El hígado graso no alcohólico es en la actualidad la principal causa de enfermedad hepática crónica y su prevalencia oscila a escala mundial entre 2.8% y 46%.

Puede presentarse desde una simple esteatosis o bien con inflamación y daño al hepatocito o esteatohepatitis. Sus manifestaciones más severas son la cirrosis hepática, hepatocarcinoma o la insuficiencia hepática. (Castro-martínez et al., 2012)

Así considerando lo anterior se analizó como influye un cambio de activación de las vías de señalización celular sobre los procesos de inflamación y estrés del retículo endoplásmico en hepatocitos con esteatosis, basándose en una dieta tipo occidental y mediterránea.

Mediante la realización de cultivos hepáticos y la realización de western blot para así obtener evidencia significativa de los efectos protectores o no de estas mezclas semejantes presentes en este tipo de dietas.

8.1 Efecto de la mezcla de ácidos grasos en el cultivo hepático

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que hay efectos protectores por parte de los AG insaturados sobre los efectos nocivos de los AG saturados, y esto lo podemos observar en la Tabla 1 *“Efecto de los tratamientos de AG en cultivo primario hepático”*

En donde podemos observar que en la imagen B) son los hepatocitos que provienen de la dieta chow y tratadas con la mezcla MED se observa una acumulación normal de vesículas de triglicéridos y tiene una morfología celular uniforme al igual que la imagen A), sin embargo en comparación con la imagen C) que es el cultivo celular tratadas con la mezcla SAT si presenta un aumento de las vesículas de triglicéridos, por lo que quiere decir que empieza un efecto nocivo dentro del hepatocito pero puede ser aun reversible porque no hay un cambio estructural dentro de la célula.

Por otro lado, en la imagen E) que proviene de la dieta western y fue tratada con la mezcla MED presentó una acumulación menor de vesículas de triglicéridos, teniendo morfología celular uniforme, que comparación de la imagen D) que fueron los hepatocitos sin tratamiento se observa un aumento de las vesículas de triglicéridos, pero en comparación de E) con F) que es el cultivo con la mezcla SAT podemos decir que hay un aumento saturado de las vesículas de triglicéridos, sin embargo se sigue conservando la morfología celular sin presentar daños en su estructura visibles.

Se puede decir que con las evidencias encontradas de la imagen E) contra las imágenes D) y F) de los hepatocitos provenientes de la dieta western y de las imágenes B) contra C) provenientes de la dieta chow da una idea que los AG insaturados tiene un efecto protector revirtiendo el efecto de los AG saturados y esto lo podemos afirmar porque muchos estudios han demostrado que los ácidos grasos saturados son más tóxicos que sus homólogos insaturados, lo que resulta en una progresiva lipotoxicidad, (Leamy et al., 2013)

8.2 Vía de señalización inflamatoria

De acuerdo a las gráficas obtenidas se puede decir que en la Gráfica 2 *“Fold Change de la expresión de las proteínas de p-STAT3”* y la Gráfica 5: *“Fold Change de la expresión de las proteínas de p-JNK”* no se encontraron diferencias significativas estadísticamente hablando, lo único que se puede observar es una ligera activación de las células hepáticas provenientes de la dieta western tratadas con la mezcla SAT, también podemos observar en dichas graficas que en las series tratadas con las mezcla MED hay un efecto protector, es decir que reducen la respuesta inflamatorio por lo que da inicio de protección al hígado del daño de los ácidos grasos saturados. En la gráfica 3: *“Fold Change de la expresión de las proteínas de p-ERK”* no se encontraron diferencias significativas estadísticamente hablando.

8.3 Vía de la señalización del Estrés del retículo endoplásmico

De acuerdo a la Gráfica obtenida para la vía de señalización para el estrés del retículo endoplásmico, la Gráfica 6 "*Fold Change de la expresión de las proteínas de p-ATF 6*" no se encontró una diferencia significativa estadísticamente hablando.

Por otro lado en la Gráfica 7 "*Fold Change de la expresión de las proteínas de p-EIF2 α* " se observa una disminución en la activación de la proteína en los hepatocitos de la dieta western con el tratamiento SAT, este comportamiento es inusual y se puede deber al tiempo de alimentación que fue de una semana y que está en etapas tempranas de NAFLD, por lo que se tendrá que realizar más experimentos para confirmar estos hallazgos.

9. CONCLUSIÓN

- Se concluye que la mezcla MED (alta en AG insaturados y baja de saturados) disminuye la esteatosis causada por una dieta alta en ácidos grasos saturados creando un efecto protector al hepatocito.
- Estos resultados evidencian que un cambio en la proporción de ácidos grasos si afecta en la esteatosis.
- Al parecer, hay un desarrollo de inflamación en etapas tempranas de la NAFLD.
- Se tendrá que realizar más estudios para validar estos hallazgos.

10. Referencias

- Aleixandre, A., & Miguel, Y. M. (2007). *Revisiones Síndrome metabólico*. 54(9), 473-478.
- Alvarez-Martínez, H., & Pérez-Campos, E. (2002). Esteatohepatitis no alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*, 67(2), 118-125.
<https://doi.org/10.1157/13047319>
- Bellanti, F., Villani, R., Facciorusso, A., Vendemiale, G., & Serviddio, G. (2017). Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 173-185.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.023>
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., Aragonès, G., & Auguet, T. (2016). Papel de las lipasas metabólicas y la lipotoxicidad en el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 28(1), 47-61. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.03.003>
- Bio-l, P. P. (n.d.). *qPROTEIN (BCA)*. 1. <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>
- Calder, P. C. (2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(1), 52-72.
<https://doi.org/10.1017/S0029665117003950>
- Calder, Philip C., & Yaqoob, P. (2009). Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgraduate Medicine*, 121(6), 148-157.
<https://doi.org/10.3810/pgm.2009.11.2083>
- Castro-martínez, M. G., Banderas-lares, D. Z., Ramírez-martínez, J. C., & Peña, J. E. (2012). *Prevalencia de hígado graso no alcohólico en individuos con síndrome metabólico*. 55, 128-132.
- Della Corte, C., & Nobili, V. (2017). Author response re. "Mediterranean diet to prevent/treat nonalcoholic fatty liver disease in children: A promising approach." *Nutrition*, 43-44, 99-100.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.025>
- Di Minno, M. N. D., Russolillo, A., Lupoli, R., Ambrosino, P., Di Minno, A., & Tarantino, G. (2012). Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 18(41), 5839-5847.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i41.5839>

- Enos, R. T., McClellan, J. L., Cranford, T. L., Michael, D., & Murphy, E. A. (2016). *Alcoholic Fatty-Liver Disease Development in a Murine Model*. 35(5), 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.04.003>. Lowering
- Escobedo, J., Schargrotsky, H., Champagne, B., Silva, H., Boissonnet, C. P., Vinueza, R., Torres, M., Hernandez, R., & Wilson, E. (n.d.). *Prevalence of the Metabolic Syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis : the CARMELA cross sectional study*. 9, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-52>
- Esteve-Lafuente, E., & Ricart-Engel, W. (2006). Esteatosis hepática y resistencia a la insulina: ¿qué ocurre primero? *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 18, 72-82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(06\)73708-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0214-9168(06)73708-1)
- Figueiredo, P. S., Inada, A. C., Marcelino, G., Cardozo, C. M. L., Freitas, K. de C., Guimarães, R. de C. A., de Castro, A. P., do Nascimento, V. A., & Hiane, P. A. (2017). Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, 9(10), 1-32. <https://doi.org/10.3390/nu9101158>
- Finicelli, M., Squillaro, T., Di Cristo, F., Di Salle, A., Melone, M. A. B., Galderisi, U., & Peluso, G. (2018). Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. *Journal of Cellular Physiology*, September 2018, 5807-5826. <https://doi.org/10.1002/jcp.27506>
- Guitérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Gaceta Médica de México*, 153, 214-228. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.47.1.1>
- Leamy, A. K., Egnatchik, R. A., & Young, J. D. (2013). Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.004>
- Li, T., Wu, Y., & He, J. (2018). Pt Sc. *Process Biochemistry*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.003>
- Lizardi-cervera, J., Ivonne, D., Laparra, B., Chávez-tapia, N. C., & Ramos, D. M. E. (2006). *Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática*. 71, 453-459.
- Manne, V., Handa, P., & Kowdley, K. V. (2018). Pathophysiology of Nonalcoholic

- Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 22(1), 23-37. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.007>
- Martinez J, Torres P, J. M. (2013). Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 56(1), 14.
- Masahide Hamaguchi, MD; Takao Kojima, MD; Noriyuki Takeda, MD; Takayuki Nakagawa, MD; Hiroya Taniguchi, MD; Kota Fujii, MD; Tatsushi Omatsu, MD; Tomoaki Nakajima, MD; Hiroshi Sarui, MD; Makoto Shimazaki, MD; Takahiro Kato, MD; Junichi Okuda, MD; and Kazun, M. (2005). *The Metabolic Syndrome as a Predictor of Nonalcoholic Fatty*. 722-729.
- Meg, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2018). *Tipos celulares HEPATOCITO*.
- Pró, E. A. (n.d.). *Anatomía Clínica* (2nd ed.). 2014.
- Rojas Lemus, M., Milán Chávez, R., Medina, A. D., Nevares, P. B., Cano Gutiérrez, G., Padilla, D. C., Cervantes Yépez, S., & Fortoul Van Der Goes, T. I. (2017). *El hepatocito como un ejemplo de la interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas*. 52-58. <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2017/un172j.pdf>
- Rosa Guillamón, A., Carrillo López, P. J., García Cantó, E., Tarraga Marcos, L., & Tarraga López, P. J. (2018). Mediterranean diet, weight status and physical activity in schoolchildren of the Region of Murcia. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, xx. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.09.002>
- Scorletti, E., & Byrne, C. D. (2018). Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. *Molecular Aspects of Medicine, March*, 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.001>
- Smit, L. A., Mozaffarian, D., & Willett, W. (2009). Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55(1-3), 44-55. <https://doi.org/10.1159/000228995>
- Wang, H., Lafdil, F., Kong, X., & Gao, B. (2011). Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci*, 7(5), 536-550. <http://dx.doi.org/>
- Yu, A., & Shargel, L. (1999). *Biopharmaceutics & Pharmacokinetics* (APPLETON &).

Anexo A

Materiales, Reactivos y Equipos:

Material	Reactivos	Equipos
Tubos falcón de 20 mL	TBS-Tween 20 0.1%	Cámara de electroforesis vertical
Tubos Eppendorf de 600 µL	TBS-Tween 20 0.05%	Cámara de electrotransferencia
Micro pipeta de 0.2- 2 µL	Leche desgrasada	Vórtex
Micro pipeta de 1 - 10 µL	Solución de Bis/Acrilamida al 30%	Fuente de poder
Micro pipeta de 2 - 20 µL	TEMED	Termo-Agitador
Micro pipeta de 20 - 100 µL	PSA 10%	Micro centrífuga
Micro pipeta de 200 - 1000 µL	SDS 10%	Agitador
Micro pipeta de 1 - 10 mL	Agua Mili-Q	Balanza analítica
Micro espátula	Buffer de Transferencia	REVCO
Puntas de 10 µL	Buffer Laemmli 1x	Fotodocumentador
Puntas de 100 µL	Buffer de Carga 2x	
Puntas de 100 µL	Buffer de stripping suave	
Puntas de 10 mL	Azul de coomassie	
Papel filtro absorbente para blot	Tris HCl pH 8.8	
Tupper de 100mL	Tris HCl pH 6.8	
Tupper de 500mL	EtOH 70%	
Charola de plástico de 50 mL	Marcador de peso molecular	
Parafilm	Metanol	
Vidrios para gel	Insta Blue (Azul de coomassie)	
Membranas de fluoruro de polivinilideno	Peroxidasa de rábano (HRP)	
Protector de acetato		
Pinzas		

Anticuerpos

Anticuerpo	Levantado en	Peso molecular	Dilución
AKT	Rabbit	60 KDa	1:1000 μ L
p-AKT	Rabbit	60 KDa	1:1000 μ L
Erk ½	Rabbit	42, 44 KDa	1:1000 μ L
p-Erk ½	Mouse	42, 44 KDa	1:1000 μ L
STAT 3	Rabbit	88 KDa	1:1000 μ L
p-STAT 3	Rabbit	88 KDa	1:1000 μ L
B-Actina	Mouse	45 KDa	1:5000 μ L
Anti-Rabbit	Rabbit		1:2500 μ L
Anti-Mouse	Mouse		1:5000 μ L

Porcentaje de concentración de los geles de Acrilamida

Gel al 15%

Agua mili Q	1.1 mL
Tris HCl pH 8.8	1.3 mL
Acrilamida	2.5 mL
SDS 10%	50 μ L
PSA 10%	50 μ L
TEMED	6 μ L
TOTAL	5 mL

Gel al 12%

Agua mili Q	1.6 mL
Tris HCl pH 8.8	1.3 mL
Acrilamida	2 mL
SDS 10%	50 μ L
PSA 10%	50 μ L
TEMED	6 μ L
TOTAL	5 mL

Gel al 10%

Agua mili Q	2.4 mL
Tris HCl pH 8.8	1.5 mL
Acrilamida	2 mL
SDS 10%	60 μ L
PSA 10%	60 μ L
TEMED	6 μ L
TOTAL	5 mL

Gel al 5%

Agua mili Q	2.1mL
Tris HCl pH 8.8	380 µL
Acrilamida	500 µL
SDS 10%	30 µL
PSA 10%	30 µL
TEMED	4 µL
TOTAL	3 mL

Actividad a realizar

1 Preparación de las muestras
1.1 El procedimiento se realiza en la mesa de trabajo
1.2 Se rotulan los tubos Eppendorf de acuerdo a los tratamientos realizados en las células hepáticas
1.3 Adicionar a cada tubo 60 µg de proteína
1.4 Adicionar 7 µL de Buffer de carga 2x a cada tubo
1.5 Adicionar Agua Mili Q necesaria para tener un volumen final de 20µL
1.6 Centrifugar las muestras en la micro centrifuga por 3 segundos
1.7 Poner los tubos con las muestras en el termo-agitador a 90 °C por 5 minutos
1.8 Terminando el tiempo las muestras se pasaran a refrigerar a 4 °C
2 Preparación del gel de acrilamida
2.1 Se montan los vidrios en los cuales se va a verter la solución de acrilamida
2.2 De acuerdo del peso molecular de la proteína que se busque determinar es la concentración de acrilamida (más de 80 KDa se usa 10%, de 60 a 80 KDa se usa el de 12% y menor de 60 KDa se usa el de 15%).
2.3 La solución se vierte entre las placas y se vierte EtOH al 70%
2.4 Se prepara el segundo gel de 5% y se descarta el EtOH de las placas
Nota* La preparación de los geles se hacen en tubos falcón de 20 mL
2.5 Se agrega la segunda solución de acrilamida al gel y se le adiciona las peinetas
2.6 Ya formado el gel se retira las peinetas y se pasa a limpiar cada pocillo con agua mili Q y con una jeringa para eliminar los rastros de acrilamida que pudieran estar ahí
3 Electroforesis
3.1 Se montan los cristales con los geles en el cartucho
3.2 El cartucho cargado se incorpora en la cámara de electroforesis y se vierte buffer laemmli entre los cristales para ver si no hay fugas
3.3 Se vierte el buffer en la cámara de electroforesis, el volumen a verter dependerá el número de geles a correr
3.4 Se cargan los geles con las muestras, en el primer pocillo debe de ir el marcador de peso molecular
3.5 Se cierra el circuito y se pone a correr a 120 V por 2 horas
4 Electro-transferencia
4.1 Se sacan los geles de los cristales y se elimina la parte superior del gel (gel de 5%)
4.2 Se vierte 50 mL de agua mili Q en el tupper de 500 mL

4.3 Se deposita el gel en el tupper con el agua
4.4 Se elimina el agua mili Q y se vierte 50 mL de Buffer de transferencia
4.5 Se activan las membranas de PVDF con metanol absoluto, se agregan 10 mL y se deja reposar por 5 minutos; Este procedimiento se realiza en una charola de plástico de capacidad de 50 mL
4.6 Se descarta el metanol y se agrega 10 mL de buffer de transferencia
4.7 Se empieza a realizar el montaje de la transferencia
4.7.1 Se pone el primer papel filtro de transferencia y se moja con buffer de transferencia
4.7.2 Sobre el papel filtro se acomoda la membrana de PVDF activada
4.7.3 Sobre la membrana se pone el gel
4.7.4 Se acomoda por último el segundo papel filtro de transferencia mojado de buffer de transferencia
4.7.5 Este conjunto se aplasta para eliminar las burbujas de aire que pudieran estar
4.8 Se cierra el circuito y se inicia la transferencia, se corre a 65 mA por gel a 1 hora y 35 minutos
5 Incorporación de los anticuerpos a la membrana
5.1 El gel se quita de la membrana y se pasa al tupper de 500 mL
5.1.1 Se adiciona 30 mL de Insta Blue al gel y se deja actuar toda la noche a temperatura ambiente (25 °C aprox)
5.2 Se lava la membrana 3 veces con 10 mL de TBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos
5.3 Se vierte 10 mL de la solución de leche desgrasada al 5% por membrana para el bloqueo, se deja por 1 hora en agitación a temperatura ambiente (25 °C aprox)
5.4 Se prepara la solución del anticuerpo primario de acuerdo a la disolución en TBS-Tween 20 0.05%
5.5 Terminando el bloque se descarta la solución de leche y se aplica el anticuerpo primario en la zona que debe de estar la proteína a identificar de acuerdo a su peso molecular
5.6 Se pone encima de la membrana un trozo de parafilm para q tenga mayor contacto el anticuerpo con la membrana y se deja actuar por toda la noche en refrigeración a 4 °C
5.6.1 En el caso de la B-Actina no se usa el parafilm, si no se deja en agitación a 4 °C
5.7 Terminando el contacto por la noche se lavan la membrana 3 veces con 10 mL de TBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos
5.8 Se prepara la solución del anticuerpo secundario de acuerdo a la disolución en TBS-Tween 20 0.05% y de acuerdo en que estaba levantado el anticuerpo primario
5.9 Se elimina la solución de TBS-Tween 20 0.1% y se agrega la solución del anticuerpo secundario y se deja en agitación por 1 hora
5.10 Terminando la hora se descarta la solución del anticuerpo y se hacen 3 lavados con 10 mL de TBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos
5.11 Terminando el tercer lavado se descarta la solución y la membrana se deja en 10 mL de TBS-Tween 20 0.1%
6 Lectura del inmunocomplejo
6.1 Se adiciona la membrana en el protector de acetato y se adiciona 800 µL de Peroxidasa de rábano (HRP)

6.2 Se introduce al fotodocumentador
6.3 Se visualiza la imagen en el fotodocumentador usando el programa ImageLab de BIO-RAD
6.4 Se descarta la membrana después de ser visualizada o se puede reutilizar la membrana para la inducción de un segundo anticuerpo (solo se pueden hacer dos lecturas de anticuerpos por membrana)
7 Reutilización de la membrana
7.1 Se lava la membrana 3 veces con 10 mL de TBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos
7.2 Se vierte 10 mL de Buffer de stripping suave y se deja en reposo por la noche a 4 °C
7.3 Se descarta el buffer de stripping suave y se lava la membrana 3 veces con 10 mL de TBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos
7.4 La membrana se trata igual a partir del punto 5.3