



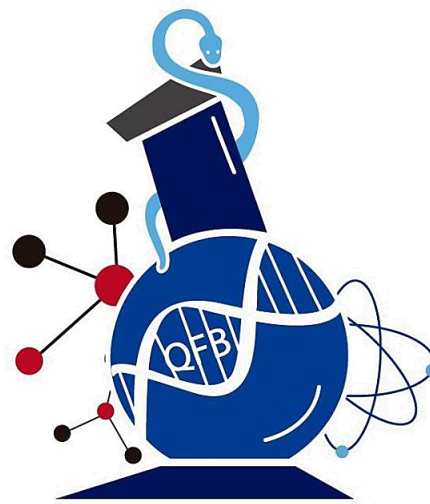
*“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS POR WESTERN BLOT EN UN MODELO DE
PARKINSON EN RATAS”*

Tutores:

 Dra. Beatriz Godínez Chaparro
 Mtro. Felipe Mendoza Pérez

Alumna:

 Nancy Lorena Pérez Ramos



ÍNDICE

	INTRODUCCIÓN	1
1	MARCO TEÓRICO	2
1.1	PARKINSON	2
1.1.1	PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	2
1.1.2	DOLOR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	2
1.1.3	TRATAMIENTO	3
1.3.3.1	PRAMIPEXOL	3
1.2	MODELO ANIMAL 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)	4
1.3	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	5
1.4	WESTERN BLOT	6
1.5	ELECTROFORESIS SDS PAGE	6
1.6	TRANSFERENCIA	7
1.7	INMUNODETECCIÓN	8
2	JUSTIFICACIÓN	9
3	OBJETIVOS	9
3.1	OBJETIVO GENERAL	9
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4	MATERIAL Y MÉTODO	9
4.1	MODELO ANIMAL	9
4.2	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	11
4.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	11
4.4	WESTERN BLOT	12
4.4.1	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS	12
4.4.2	TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A UNA MEMBRANA	12
4.4.3	INMUNODETECCIÓN	12
4.4.4	REVELACIÓN	13
5	RESULTADOS	13
5.1	EXTRACCIÓN 0.1 % TRITÓN – B-ACTINA	13
5.2	EXTRACCIÓN 0.1 % TRITÓN – IL-6	14
6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	14
7	CONCLUSIÓN	17
8	BIBLIOGRAFÍA	18

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común que afecta al 2-3% de la población mayor a 65 años de edad. La pérdida neuronal en la sustancia nigra, que causa la deficiencia de dopamina en el cuerpo estriado, y las inclusiones intracelulares que contienen agregados de α -sinucleína son las características neuropatológicas de la EP. Aunque el diagnóstico clínico se basa en la presencia de bradicinesia y otras características motoras cardinales, la EP se asocia con muchos síntomas no motores que se suman a la discapacidad general (Poewe, Seppi, & al., 2017).

En el momento actual se dispone de formas de liberación prolongada (LP) de pramipexol y ropinirol y de administración transdérmica de rotigotina, que contribuyen a una mayor estabilidad plasmática de los valores del fármaco. En la EP inicial los 3 fármacos mejoran de forma significativa las escalas de incapacidad de los pacientes, retrasan la aparición de discinesias y permiten retrasar la introducción de levodopa (Alonso Cánovasa, 2014). Un signo característico que surge como consecuencia de EP son los espasmos distónicos. Los espasmos distónicos están entre los síntomas más dolorosos que una persona con EP puede experimentar. El dolor surge de los continuos movimientos severos, y con fuerza, de retorcimiento o torsión, así como de las posturas a las que se denominan distonía. La distonía en la EP puede afectar las extremidades, el tronco, el cuello, la lengua, la quijada, los músculos deglutorios (que ayudan a tragar) y las cuerdas vocales (Escriche-Jaime, 2008).

Los tratamientos que se emplean en la actualidad pertenecen a una clase de medicamentos llamados agentes del sistema nervioso central. Su acción consiste en convertirse en dopamina en el cerebro por lo que es un tratamiento que proporciona un mejor control y más eficaz de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, sin embargo, no contribuye a la mejora de síntomas secundarios como lo son los espasmos distónicos y el dolor que estos generan (Escriche-Jaime, 2008).

Se analizó la capacidad nociceptiva de Pramipexol en un modelo de Parkinson en ratas. A través de un ensayo de Western Blot se determinó la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 y de β -actina en muestras de cerebro, medula y ganglios, en grupos de ratas tratados con 6-OHDA (Hidroxidopamina) + Levodopa y grupos intervenidos con 6-OHDA y Pramipexol, dejando un campo abierto para realizar más investigaciones a futuro que contribuyan a mejorar el tratamiento de síntomas secundarios que genera la enfermedad de Parkinson y no están relacionados directamente con el movimiento involuntario (Escriche-Jaime, 2008).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Parkinson

1.1.1 Patología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, se estima que afecta a más de 6 millones de personas en todo el mundo. Aún se desconoce la causa exacta de la EP, pero se han identificado varios mecanismos moleculares en la patología. Estos incluyen neuroinflamación, disfunción mitocondrial, degradación disfuncional de proteínas y patología de la alfa-sinucleína (α -sinucleína). Las principales características de la enfermedad comprenden la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars-compacta y la presencia de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy en el cerebro del paciente (Tuuli- María Sonnien, 2010).

La pérdida de neuronas dopaminérgicas y la consiguiente disminución de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado se consideran responsables de los síntomas típicos del movimiento (bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural). No existe cura para el Parkinson y actualmente los tratamientos están dirigidos a aliviar los síntomas motores con terapia de reemplazo de dopamina y cirugía (Tuuli- María Sonnien, 2010).

1.1.2 Dolor en la enfermedad de Parkinson

A lo largo del curso de la enfermedad de Parkinson, desde la etapa prodrómica hasta la paliativa, el dolor es un síntoma no motor significativo y problemático, que afecta negativamente la calidad de vida relacionada con la salud. Los pacientes con enfermedad de Parkinson pueden experimentar una variedad de síndromes de dolor diferentes, con variaciones en la causa, origen, ubicación y cronicidad. Se pueden identificar y clasificar múltiples modalidades del dolor de la EP utilizando las escalas basadas en evaluadores específicos para la calificación del grado de dolor (Katarina Rukavina, 2019).

Generalmente, el dolor puede clasificarse como nociceptivo: dolor que surge debido a la activación de los nociceptores causada por un daño real o potencial al tejido no neuronal; o dolor neuropático: dolor asociado con lesiones del sistema somatosensorial central o periférico. En pacientes con enfermedad de Parkinson, los cambios neurodegenerativos específicos que involucran tanto vías dopaminérgicas como estructuras mediadoras del dolor no dopaminérgicas pueden causar alteraciones en la transmisión periférica y el procesamiento sensorial-discriminativo, percepción e interpretación del dolor en múltiples niveles (Yazeed Buhidma, 2020).

1.1.3 Tratamiento

La levodopa continúa siendo el fármaco más eficaz para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson, sin embargo, su relación con la aparición de las complicaciones motoras (fluctuaciones y discinesias) limita parcialmente su uso. Los agonistas dopaminérgicos ofrecen una alternativa eficaz y segura a levodopa y su utilización se asocia a una menor incidencia de complicaciones motoras. Los agonistas dopaminérgicos no ergóticos pueden administrarse por vía oral (pramipexol), transdérmica (rotigotina) o subcutánea (apomorfina).

Los agonistas dopaminérgicos, aunque no están exentos de efectos adversos graves entre los que destaca el trastorno de control de impulsos (TCI), han tenido un impacto indiscutible en la calidad de vida de los pacientes con Parkinson y han ampliado notablemente el abanico de estrategias terapéuticas disponibles (Alonso Canovas, 2014).

1.1.3.1 Pramipexol

Su nombre químico es (S)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilamino-benzotiazol. Se trata de un potente agonista D₂ con afinidad máxima por el subtipo D₃. La absorción de pramipexol es rápida, alcanzándose una concentración máxima entre 1 y 2 h después de su administración. Su biodisponibilidad es elevada, en torno al 90%. La farmacocinética es lineal, la unión a proteínas es escasa (< 20%) y el volumen de distribución es elevado (400 L). Se elimina sin metabolizar en su mayor parte (80%) por la orina (secreción tubular activa).

A pesar de su buen perfil de seguridad, la aparición de efectos adversos y el potencial patoplástico del pramipexol debe tenerse en cuenta a lo largo del tratamiento (tabla 1)

Tabla 1. Efectos adversos dopaminérgicos de pramipexol y ropinirol frente a placebo

EFEECTO ADVERSO	PRAMIPEXOL (%) [% PLACEBO]	ROPINIROL (%) [%PLACEBO]
En monoterapia		
• Náuseas	39 [20,5]	52,6 [21,6]
• Mareo	-	36,2 [18,4]
• Somnolencia	18,3 [8,8]	36,3 [4,8]
• Hipotensión	9,8 [5,6]	10,3 [1,6]
En adyuvancia con levodopa		
• Náuseas	28 [18]	30 [18]
• Mareo	26 [25]	26 [16]
• Somnolencia	9 [6]	20 [8]
• Alucinaciones	17 [4]	10 [4]
• Discinesias	47 [31]	34 [13]

1.2 Modelo animal de la Enfermedad de Parkinson usando 6-hidroxidopamina

Se han utilizado modelos animales que reproducen los principales procesos celulares de la EP, como el estrés oxidativo, la neurodegeneración, la neuroinflamación y la muerte celular, para evaluar la neurodegeneración en la EP. Algunos de los compuestos neurotóxicos más utilizados son: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA). El MPTP cruza la barrera hematoencefálica (BHE), causando no solo daño a la vía nigroestriatal, sino también pérdida de neuronas GABAérgicas estriatales y neuronas en el área tegmental ventral y en el núcleo retrorubral. La 6-OHDA es el fármaco más utilizado para inducir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal, debido a su incapacidad para cruzar la BHE y su selectividad por las neuronas dopaminérgicas de la Substancia nigra compacta (SNcp).

La 6-OHDA es un análogo de la dopamina, altamente oxidable y que puede ser captada por el transportador de dopamina, lo que permite dañar selectivamente las neuronas catecolaminérgicas, como las neuronas dopaminérgicas de la SNcp. Hasta la fecha, se han propuesto 3 mecanismos para explicar el efecto citotóxico de la 6-OHDA: 1) autooxidación intra o extracelular de 6-OHDA, que favorece la producción de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo, 2) formación de peróxido de hidrógeno debido a la acción de la monoaminoxidasa y 3) inhibición directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos mecanismos pueden actuar de forma independiente o combinada para generar especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo resultante puede intensificarse por un aumento del calcio libre citoplásmico (como resultado de la excitotoxicidad del glutamato o de la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, induciendo finalmente la muerte celular (Héctor de Jesús Cortés, 2015).

El cuerpo estriado de la rata se ha subdividido en 2 regiones, las regiones dorsomedial y ventrolateral, que están inervadas por núcleos específicos. La región ventrolateral recibe aferencias de las áreas motoras y sensitivo-motoras de la corteza y está inervada exclusivamente por neuronas que se originan en la SNcp. La región dorsomedial del cuerpo estriado está inervada por neuronas que se originan en la SNcp, en el área tegmental ventral, área cortical frontal y sistema límbico. Las lesiones que provoca la 6-OHDA en el cuerpo estriado dorsomedial tienen un efecto general sobre la locomoción y el comportamiento de giro inducido por fármacos (anfetamina y apomorfina), mientras que las lesiones en el cuerpo estriado ventrolateral tienen efectos marcados sobre el inicio del movimiento, la orientación sensoriomotora y el comportamiento motor fino, todos los cuales son signos típicos de la enfermedad de Parkinson. La inmunohistoquímica representativa de la tirosina hidroxilasa (TH) en el SNpc muestra que el lado no inyectado (izquierda) no muestra una reducción en las células TH-positivas en ningún grupo, mientras que el lado inyectado (derecha) muestra una reducción prominente en la tinción de TH solo en ratas que fueron expuestas a 6-OHDA y luego se le administró el vehículo (figura 1) (Hernández Baltazar, 2017).

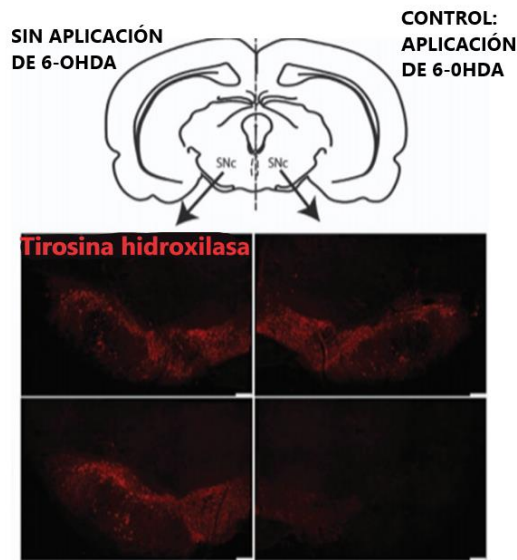


Figura 1. Procedimiento de generación de Parkinson con 6-OHDA; aplicación unilateral con respecto al haz medial del cerebro anterior (coordenadas relativas a Bregman: anterior- 4.0 mm; lateral- 0.8 mm; ventral- 8.0 mm Imagen extraída de: (Héctor de Jesús Cortés, 2015)

1.3 Determinación de proteínas por el método de Lowry

El método más preciso para determinar la concentración de proteínas es probablemente la hidrólisis ácida seguida de un análisis de aminoácidos. La mayoría de los demás métodos son sensibles a la composición de aminoácidos de la proteína y no se pueden obtener concentraciones absolutas. El procedimiento de Lowry no es una excepción, pero su sensibilidad es moderadamente constante de una proteína a otra, y se ha utilizado tan ampliamente que las estimaciones de proteínas de Lowry son una alternativa completamente aceptable a una determinación absoluta rigurosa en casi todas las circunstancias en las que las mezclas de proteínas o los extractos crudos están involucrados. El método se basa tanto en la reacción de Biuret, en la que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el cobre en condiciones alcalinas para producir Cu^+ , que reacciona con el reactivo de Folin, como en la reacción de Folin-Ciocalteau, que no se comprende bien, pero en esencia el fosfomolibdotungstato es reducido a azul de heteropolibdeno por la oxidación catalizada por cobre de aminoácidos aromáticos. Las reacciones dan como resultado un color azul intenso, que depende en parte del contenido de tirosina y triptófano (Waterborg, 2009). El color se genera mediante dos pasos: 1) formación de proteína y complejo de cobre en un tampón alcalino, y 2) reacción de reducción del reactivo de Folin que provoca un cambio espectral de 405 nm a 750 nm, con rendimiento máximo a 750 nm (Tzong-Shi Lu, 2010).

1.4 Western Blot

El Western Blot se utiliza a menudo para separar e identificar proteínas. En esta técnica se separa una mezcla de proteínas en función del peso molecular mediante electroforesis en gel. Posteriormente estas proteínas se transfieren a una membrana de Nitrocelulosa. Luego, la membrana se incuba con anticuerpos marcados específicamente para la proteína de interés. El anticuerpo no unido se lava dejando solo el anticuerpo unido a la proteína de interés. Por último, se incuba con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (HRP) para detectar la reacción primaria., los anticuerpos unidos se detectan revelando la película. Como los anticuerpos se unen a la proteína de interés, solo debe ser visible la banda específica (Yang Deyu & al., 2012).

1.5 Electroforesis

1.5.1 Preparación de la muestra

Los lisados celulares son la forma más común de muestra utilizada para la transferencia de Western. La extracción de proteínas permite recolectar las proteínas totales de las células. Esto debe hacerse a temperatura fría con inhibidores de proteasa para evitar la desnaturalización de las proteínas. Dado que la muestra de tejido presenta un mayor grado de estructura, para la extracción de proteínas se requiere de un método de rompimiento, como la homogeneización o la sonicación. Después de extraer la proteína, es muy importante tener una concentración específica del extracto para asegurarse de que las muestras se comparan sobre una base equivalente específica (Yang Deyu & al., 2012).

1.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) de Laemmli U.K utiliza dos tipos diferentes de gel de poliacrilamida: gel concentrador y separador. El gel concentrador es ligeramente ácido (pH 6,8) y tiene una concentración de acrilamida más baja, lo que hace un gel con un mayor tamaño de poro, este es donde las proteínas de la muestra se van a concentrar. El gel inferior, llamado gel de separador o resolutivo, es básico (pH 8,8) y tiene un mayor contenido de poliacrilamida, lo que hace que los poros del gel sean más estrechos. Por lo tanto, las proteínas se separan selectivamente por su peso molecular, ya que las proteínas más pequeñas viajan con mayor facilidad y, por lo tanto, más rápido que las proteínas más grandes. Las proteínas cuando se cargan en el gel tienen una carga negativa, ya que se han desnaturalizado debido a la adición de un detergente aniónico (SDS), y viajarán hacia el electrodo positivo cuando se aplica un voltaje. Los geles generalmente se elaboran vertiéndolos entre dos placas de vidrio o plástico, utilizando la solución descrita en la sección de protocolo. Las muestras y un marcador se cargan en los pocillos y los pocillos vacíos se cargan con tampón de muestra (figura 2). Luego, el gel se conecta a la fuente de alimentación y se deja correr hasta que el frente de corrida esté a punto de llegar al final del gel. El voltaje es muy importante, ya que un alto voltaje puede sobrecalentar y distorsionar las bandas (Waterborg, 2009).

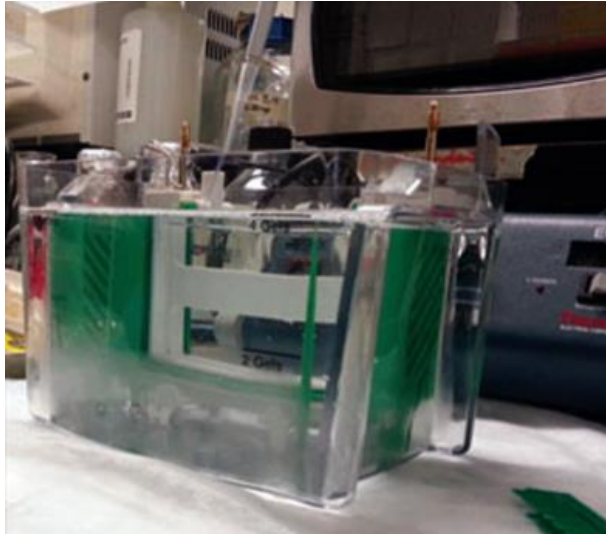


Figura 2. Fuente de alimentación cargada con buffer de corrida y muestras.

1.6 Electrotransferencia

Después de separar las proteínas, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realiza mediante un campo eléctrico orientado perpendicularmente a la superficie del gel, lo que hace que las proteínas se muevan fuera del gel hacia la membrana. La membrana se coloca entre la superficie del gel y el electrodo positivo en un sándwich. El sándwich incluye una almohadilla de fibra (esponja) en cada extremo y papeles filtro para proteger el gel y la membrana (figura 3). Aquí dos cosas son muy importantes: (1) el contacto cercano del gel y la membrana para asegurar una imagen clara y (2) la colocación de la membrana entre el gel y el electrodo positivo. La membrana debe colocarse como tal, de modo que las proteínas cargadas negativamente puedan migrar del gel a la membrana. Este tipo de transferencia se denomina transferencia electroforética y se puede realizar en condiciones semisecas o húmedas. Las condiciones húmedas suelen ser más fiables, ya que es menos probable que seque el gel y se prefieren para proteínas más grandes. La membrana, el soporte sólido, es parte fundamental de este proceso. Hay dos tipos de membranas: nitrocelulosa y PVDF. La nitrocelulosa se utiliza por su alta afinidad por las proteínas y su capacidad de retención. Sin embargo, es frágil y no permite reutilizar la membrana. En este sentido, las membranas de PVDF proporcionan un mejor soporte mecánico y permiten reutilizar nuevamente el ensayo. Sin embargo, el fondo es más alto en las membranas de PVDF y, por lo tanto, lavar con cuidado es muy importante (Waterborg, 2009).

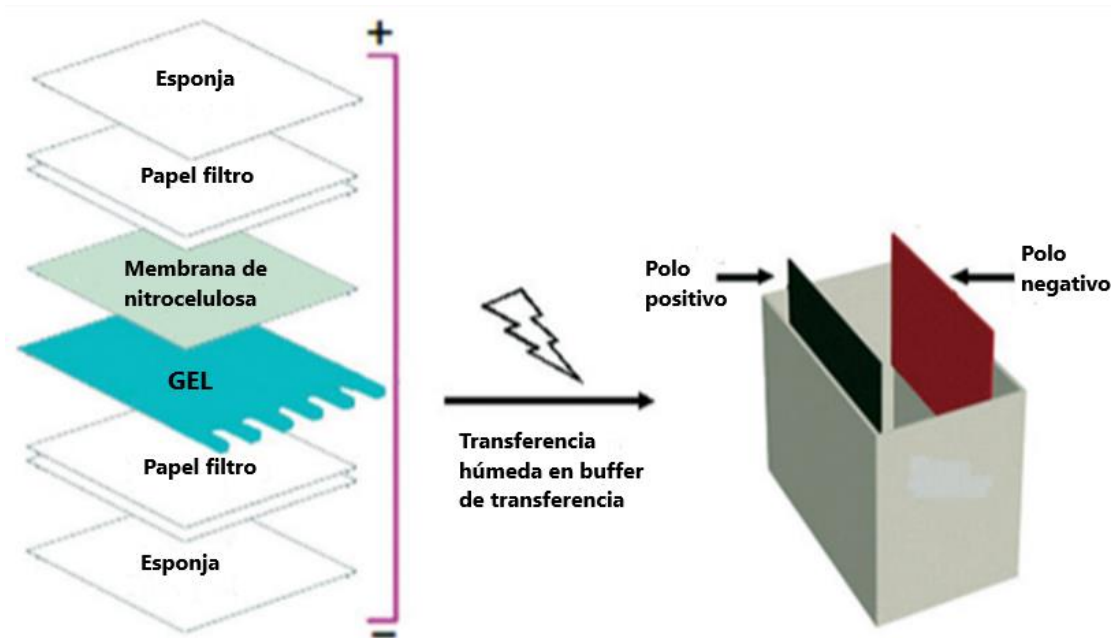


Figura 3. Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa, que se incubará con un anticuerpo primario específico de la proteína de interés.

1.7 Inmunodetección

El bloqueo es un paso muy importante de la transferencia Western, ya que evita que los anticuerpos se unan a la membrana de forma inespecífica. El bloqueo a menudo se hace con 5% de BSA o leche en polvo descremada diluida en TBS-Teen (TBS-T) para reducir el fondo.

La concentración del anticuerpo primario depende de las instrucciones del fabricante. El anticuerpo se puede diluir en un tampón de lavado, como PBS-T o TBS-T. El lavado minimiza el fondo y elimina los anticuerpos no unidos. Sin embargo, la membrana no debe dejarse lavar durante mucho tiempo, ya que también puede reducir la señal (Waterborg, 2009).

El anticuerpo primario unido al antígeno se detecta usando el anticuerpo secundario, generalmente acoplado a una enzima como la peroxidasa de rábano picante (HRP), que es detectada por la señal que produce correspondiente a la posición de la proteína diana. Esta señal se detecta en una cámara de quimioluminiscencia (figura 4) (Tahrin Mahmood, 2012).



Figura 4. Representación paso a paso para un ensayo de inmunotransferencia.

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta (SNc) y la presencia generalizada de agregados de α -sinucleína (Deleidi y Gasser, 2013). Se caracteriza por alteraciones motoras como rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural y temblor en reposo.

Se ha sugerido que la activación de las células gliales puede estar involucrada en la neurodegeneración del SNc y de esta manera contribuir en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson. Estudios previos han demostrado que la lesión dopaminérgica con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) activan la microglía produciendo la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por otra parte, se ha observado que el pramipexol inhibe la expresión de NF κ B en animales con dolor inflamatorio (Julia Pérez & al, 2023). Por esta razón, resulta interesante investigar si pramipexol inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6 en la médula espinal de animales con la enfermedad de Parkinson.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6) en la médula espinal obtenida de ratas con la enfermedad de Parkinson

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mediante la técnica de Western Blot estudiar la expresión de citocinas proinflamatorias
- Determinar la expresión de IL-6 y β -actina en ratas con la enfermedad de Parkinson

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES

Cirugía de lesión bilateral SNc con 6-OHDA

Anestesiarse las ratas con una mezcla de ketamina/xilacina (60/10 mg/kg vía intraperitoneal).

Colocar los animales en un marco estereotáxico con el propósito de exponer el cráneo del animal. Posteriormente inyectar 6-OHDA (16 μ g/mL) unilateralmente con respecto al haz medial del cerebro anterior (coordenadas relativas a Bregman: anterior- 4.0 mm; lateral- 0.8 mm; ventral- 8.0 mm)

Para preservar las neuronas adrenérgicas de la toxicidad de la 6-OHDA, colocar a los animales una inyección de desipramina (25 mg/kg vía intraperitoneal 30 minutos antes de

la colocación de 6-OHDA; en las ratas del grupo Sham únicamente colocar el vehículo en las mismas coordenadas.

Posterior a la incisión dejar a los animales en un periodo de recuperación de 7 días.

Posterior al periodo de recuperación, distribuir a las ratas en distintos grupos experimentales (n=12).

Distribución de los grupos experimentales

Grupo Sham (solución salina fisiológica SSF al 0.9% 1 vez al día por diez días)

Grupo 6-OHDA (SSF al 0.9% 1 vez al día por diez días).

Grupo 6-OHDA + L-Dopa (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 mg/kg 1 vez al día por 20 días).

Grupo de 6-OHDA + Pramipexol (0.03, 0.3, 3.9 y 30 mg/kg 1 vez al día por 20 días).

Posteriormente, evaluar la conducta motora: Prueba de apomorfina (día 15), prueba de cilindro (0, 14, 29 días) y prueba de campo abierto (0, 14, 29 días)

Pruebas motoras

Prueba de Apomorfina

Seis días posteriores a la lesión unilateral en el SNc con 6-OHDA, evaluar en las ratas el número de giros inducidos por la administración de apomorfina (1 mg/kg) disuelta en ácido ascórbico al 0.02% SSF al 0.9% (1 mg/mL).

Cinco minutos después, registrar el número total de rotaciones completas (360°) durante una hora.

Prueba de cilindro

Treinta días después de la lesión unilateral con 6-OHDA evaluar la acinesia de la extremidad anterior con la prueba de cilindro.

Colocar a los animales en cilindros de 30 cm de altura y 20 cm de diámetro, suficientes para que la rata pueda girar libremente durante 5 minutos cada 3 días para evitar la habituación de las ratas a su entorno.

Contar el número de contactos en la pared del cilindro realizado con los miembros anteriores.

Clasificar los contactos de la pared del cilindro como: Miembro anterior contralateral (MAC); Miembro anterior ipsilateral (MAI) o ambos miembros anteriores (AMA).

Para considerarse una prueba válida deben ser registrar un mínimo de ocho contactos por ensayo.

Calcular el porcentaje de utilización de los miembros anteriores en relación con el número de contactos totales realizados por el animal.

Prueba de campo abierto

Colocar a los animales en un área de acetato cuadrangular plana con medidas de 72 x 72 cm, rodeado de paredes de 30 cm de altura.

Dividir el área en 17 cuadros de 18 X 18 cm, 16 de ellos en azul y uno más en el centro del área en rojo, éste último con fines de ubicación en el área central del campo abierto.

Cuantificar el número de cuadros recorridos por rata de cada grupo, así como el tiempo de congelamiento durante cinco minutos utilizando grabaciones.

4.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Extracción y homogeneización del tejido.

Se obtuvo la medula espinal de ratas eutanizadas por decapitación mediante presión hidráulica y se homogeneizó para la obtención de proteínas totales en una solución que contiene: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Tritón X-100, 1 mM EDTA y 4 µl de coctel de inhibidores de proteasas.

Posterior al proceso de extracción se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su uso.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

- De una solución estándar de BSA 1 mg/ml hacer una dilución 1:10 y proceder a preparar la curva de calibración de acuerdo con la tabla 2.

TUBO	BSA ml	H ₂ O ml	µg/ml	REACTIVO 1	REACTIVO 2
1	0.00	1.00	0	3.0	0.3
2	0.20	0.80	20	3.0	0.3
3	0.40	0.60	40	3.0	0.3
4	0.60	0.40	60	3.0	0.3
5	0.80	0.20	80	3.0	0.3
6	1.00	0.00	100	3.0	0.3

- Preparar 1 ml de las diluciones 1:50, 1:100, 1:200 y 1:500 de la muestra problema.
- Adicionar el reactivo 1 tanto a tubos de la curva de calibración como a los de las diluciones de la muestra; incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar el reactivo 2 tanto a tubos de la curva de calibración como a los de las diluciones de la muestra; incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Leer las muestras en espectrofotómetro a λ 540 nm.

4.4 WESTERN BLOT

4.4.1 Separación de proteínas por electroforesis

- Construir el gel de corrida y el gel concentrador de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Construcción del gel de corrida y gel concentrador

Gel de poliacrilamida al 12 %		Gel concentrador al 4%	
Agua	6.7 ml	Agua	6.1 ml
Tris 8.8	5 ml	Tris 8.8	2.5 ml
SDS	200 μ l	SDS	100 μ l
Acrilamida	8 ml	Acrilamida	1.33 ml
APS	120 μ l	APS	50 μ l
TEMED	10 μ l	TEMED	12 μ l

- Cargar las muestras con buffer de carga + BME 1:1 y calentar 5 minutos a baño maría.
- Correr la electroforesis a 150 V por 2 horas.

4.4.2 Transferencia

- Cortar la membrana al tamaño del gel. Hidratar la membrana de nitrocelulosa en agua y dejar equilibrando 15 minutos en buffer de transferencia.
- Colocar sobre el cassette de transferencia y en el siguiente orden: esponja – papel filtro – gel – membrana – papel filtro – esponja. Verificar que el gel quede hacia el cátodo negro (-) y la membrana hacia el ánodo rojo (+). Transferir a 30 volts durante 70 minutos.

4.4.3 Inmunodetección

β -actina

- Bloquear los sitios no específicos incubando la membrana en la solución de leche al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador.
- Lavar la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %. Enjuagar ligeramente la membrana, cambiar el buffer y dejar en agitación durante 10 minutos. Hacer 4 lavados de 10 minutos en agitación a temperatura ambiente usando grandes volúmenes de buffer.
- Incubar con β -actina. Diluir la β -actina en una concentración 1:1000 en solución bloqueadora (solución de leche al 5% en PBS) y dejar incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El tiempo de incubación y la temperatura se pueden variar hasta lograr las condiciones óptimas.
- Realizar nuevamente 4 lavados de 10 minutos a la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %.
- Diluir el segundo anticuerpo en una concentración 1:2500 e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.
- Realizar nuevamente 4 lavados de 10 minutos a la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %.
- Dejar la membrana en PBS pH 7.2

IL-6

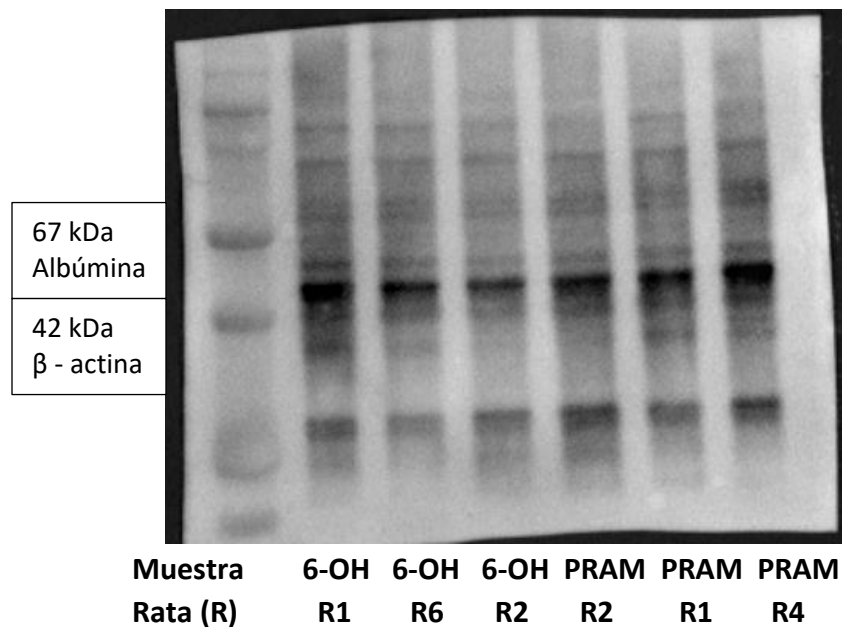
- Bloquear los sitios no específicos incubando la membrana en la solución de leche al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador.
- Lavar la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %. Enjuagar ligeramente la membrana, cambiar el buffer y dejar en agitación durante 10 minutos. Hacer 4 lavados de 10 minutos en agitación a temperatura ambiente usando grandes volúmenes de buffer.
- Incubar con IL-6 a una concentración de 0.1µg/mL en solución bloqueadora y dejar incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El tiempo de incubación y la temperatura se pueden variar hasta lograr las condiciones óptimas.
- Realizar nuevamente 4 lavados de 10 minutos a la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %.
- Diluir el anticuerpo secundario IgG anti-cabra en una concentración 1/10000 e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.
- Realizar nuevamente 4 lavados de 10 minutos a la membrana con PBS–Tween 20 al 0.1 %.
- Dejar la membrana en PBS pH 7.2.

4.4.4 Revelación

- Eliminar los excesos de PBS colocando la membrana en papel filtro.
- Revelar con luminol

5. RESULTADOS

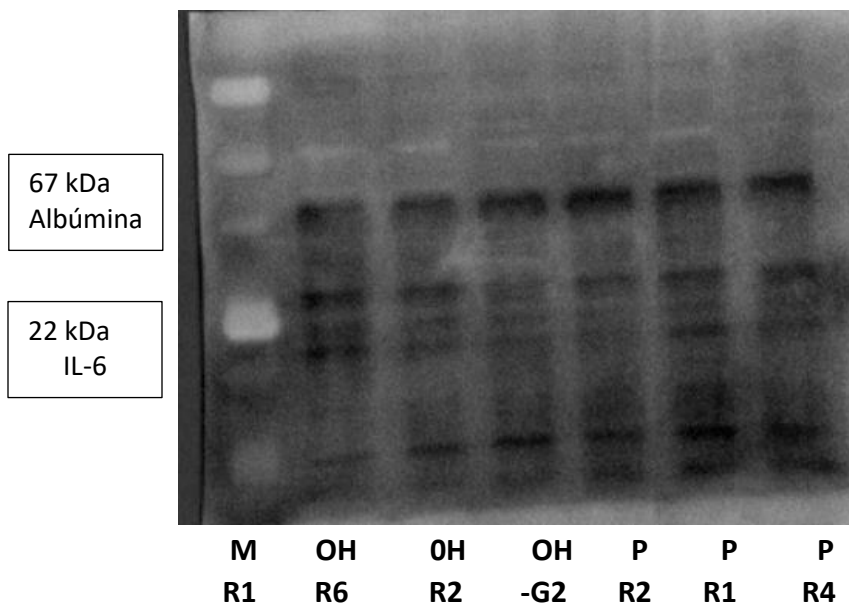
5.1 extracción 0.1 % tritón – β-actina



En las muestras de ratas intervenidas con 6-OH se observa la señalización que corresponde a la β- actina debido al ruido que presentan las bandas. La señal de la β-actina se observa

tanto en las muestras de las ratas intervenidas y no tratadas, como en las ratas a las que fue administrado el tratamiento de pramipexol.

5.2 extracción 0.1 % tritón – IL-6



En la imagen de referencia no se alcanzan a distinguir las bandas de IL-6, debido al ruido que se generó desde la inmunotransferencia.

6. DISCUSIÓN

El Western Blot es hoy en día una técnica de uso cotidiano en el laboratorio que permite la identificación de proteínas específicas en diferentes muestras biológicas. Los diferentes pasos que se deben seguir durante la realización, convierten al Western Blot en una técnica larga, pero por otro lado nos ofrece un resultado más preciso. En nuestro experimento no se logró interpretar un resultado confiable debido a que en los Western Blot realizados no se obtuvieron bandas bien definidas, esto puede ser asociado a diferentes causas, entre ellas el ruido que se generó al ingresar burbujas de aire durante el proceso de transferencia.

Con base en los pesos moleculares de las proteínas de nuestro interés, las bandas se observan en la parte media de la membrana tomando como referencia la figura 5 que muestra la localización de bandas en geles a diferentes concentraciones de poliacrilamida. Debido a que no obtuvimos imágenes claras, podemos ofrecer una aproximación a los resultados que se esperaban obtener en cuanto a la señalización de IL-6 y β -actina.

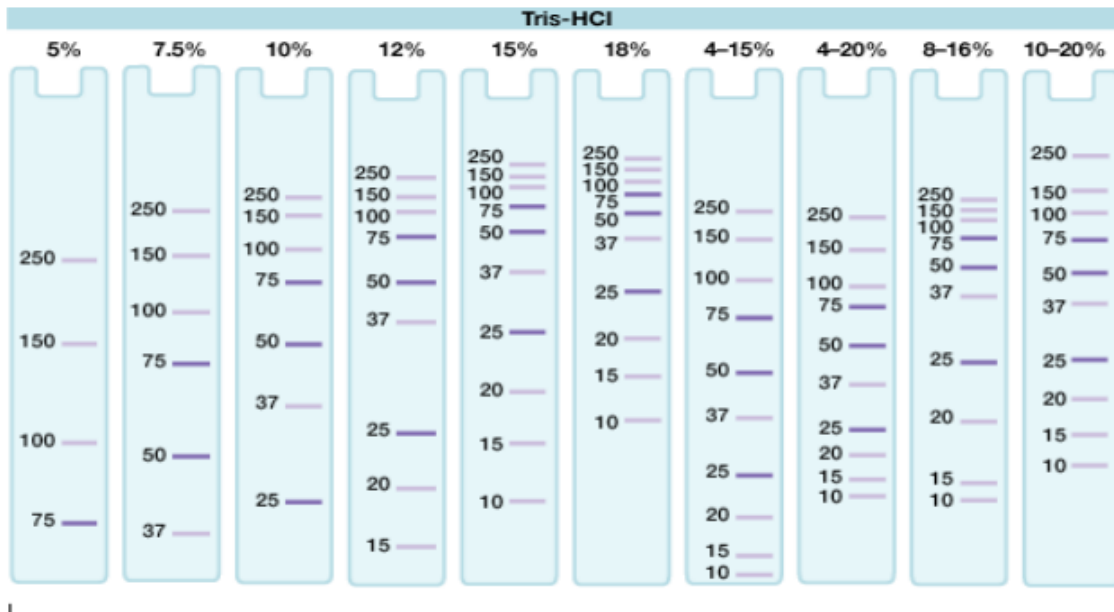


Figura 5. Bandas de señalización en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones.

El peso de la β -actina corresponde a 42 kDa, en trabajos anteriores se han observado bandas de β -actina marcadas entre los 50 y 35 kDa (Yang Deyu & al., 2012), si realizamos una comparación entre los resultados que obtuvimos y las bandas representadas en la figura 6 podríamos asegurar que corresponde a la β -actina. Tenemos que considerar que en las muestras de las ratas intervenidas con 6-OH sin tratamiento y las muestras del grupo intervenido con 6-OH tratadas con pramipexol no hay una diferencia significativa en cuanto al ancho de las bandas, lo que puede inferir en que el pramipexol no disminuye la producción de IL-6 en ratas con la enfermedad de Parkinson.

Figura 6 anti actina

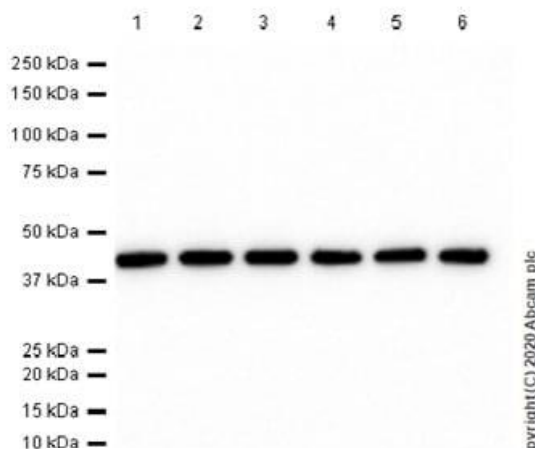


Figura 6. Western Blot – anticuerpo Anti β -Actina

El peso molecular de la IL-6 es de aproximadamente 22 kDa, las bandas de señalización se localizan principalmente en la parte inferior de geles de poliacrilamida preparados al 12% (figura 7).

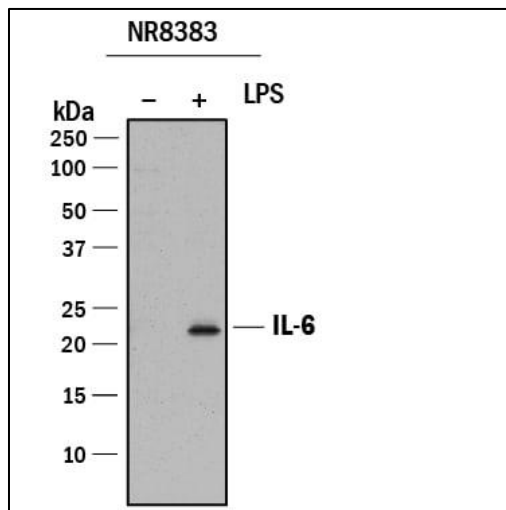


Figura 7. Western blot- anticuerpo anti IL-6

Los geles que se obtuvieron después de la incubación con el anticuerpo no muestran bandas limpias o bien localizadas, si realizamos una comparación entre bandas que corresponden a la señalización de la IL-6 y las bandas que obtuvimos, podríamos inferir que corresponden a IL-6, sin embargo, al no obtener imágenes bien definidas, no podemos aseverar si la producción de interleucina 6 en ratas intervenidas con 6-OH tratadas con levodopa, pramipexol y grupo Sham presenta variabilidad significativa (figura 8).

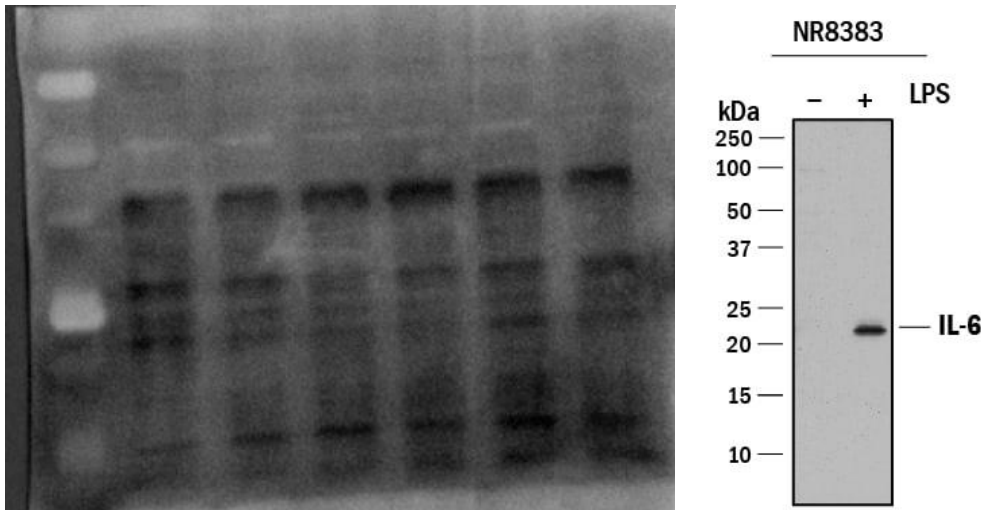


Figura 8. En la figura se encuentran las bandas incubadas con anti IL-6 de muestras obtenidas de ratas con 6-OH tratadas con pramipexol y sin tratamiento. En la figura b se localiza un Western Blot de una muestra incubada con IL-6.

Se recomienda repetir los ensayos presentando mayor énfasis y cuidado al momento de realizar la inmunotransferencia, ya que en el primer ensayo que se realizó ingresaron burbujas de aire entre la membrana y el gel, lo cual generó ruido al momento de hacer la incubación con los anticuerpos.

7. CONCLUSIONES

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento neurodegenerativo que afecta alrededor de seis millones de personas en todo el mundo, las principales características de la enfermedad comprenden la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars-compacta y la presencia de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy en el cerebro del paciente, el objetivo de este trabajo fue poner a prueba la capacidad del Pramipexol para disminuir la nocicepción que se genera como consecuencia del padecimiento.

En la actualidad los tratamientos para la EP se basan en aumentar el número de neuronas dopaminérgicas, este grupo de medicamentos ayudan a controlar los problemas para caminar, relacionados con el movimiento y los temblores. El Pramipexol es un medicamento agonista de dopamina y se utiliza para tratar los síntomas de la EP, incluyendo los temblores de partes del cuerpo, la rigidez, la lentitud de movimientos y problemas de equilibrio. El dolor es un síntoma secundario que se genera como consecuencia de la EP, se realizaron múltiples análisis para medir la capacidad nociceptiva del pramipexol ante este padecimiento, sin embargo, debido a los distintos retos a los que nos enfrentamos en la realización del western Blot, se recomienda continuar realizando estudios para tener resultados más precisos, de igual manera se abre un campo de estudio muy amplio en el que se puede evaluar la capacidad anti nociceptiva de los tratamientos que se encuentran disponibles para tratar la Enfermedad de Parkinson.

El principal objetivo de este trabajo fue estandarizar las diluciones de los anticuerpos primarios y secundario y tratar de obtener las condiciones optimas de detección de IL-6 y β actina.

Bibliografía

- A. Alonso Canovas, R. L. (2014). Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. *Neurología*.
- A. Alonso Cánovasa, R. L. (2014). Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. *Neurología* , 230-241.
- D. Escriche-Jaime, E. C.-G. (2008). Disonía-parkinsonismo de inicio rápido: forma esporádica. *Neurología* .
- D. Hernández Baltazar, L. M. (2017). El modelo de 6-Hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: Nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*.
- Deleidi M, G. (2013). The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Life sciences* .
- Héctor de Jesús Cortés, A. D. (2015). Protective efficacy of P7C3-S243 in the 6-Hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Nature*.
- José A. Obeso, M. C. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle . *Nature medicine* .
- Julia Pérez, F. M., & al, e. (2023). Pramipexole inhibits formalin- induce acute and long-lasting mechanical hypersensitivity via NF-kB pathway in rats. *Drug Development Research*.
- Katarina Rukavina, V. L. (2019). Pain in Parkinson's disease: nex concepts in pathogenesis and treatment. *Co-Neurology*.
- Poewe, W., Seppi, K., & al., e. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*.
- Tahrin Mahmood, P.-C. Y. (2012). Western Blot: Technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* .
- Tuuli- María Sonnien, R. H. (2010). Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes. *Nature medicine* .
- Tzong-Shi Lu, S.-Y. Y. (2010). Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *North American Journal of Medical Sciences* .
- Waterborg, J. H. (2009). *The protein protocols handbook*. New Jersey: Humana Press.
- Yang Deyu, C. K., & al., e. (2012). b-Actin as a loading control for plasma-based Western blot analysis of major. *Analytical biochemistry*, 116-120.
- Yazead Buhidma, K. R. (2020). Potential of animal models for advancing the understanding an treatment of pain in Parkinson's disease . *Nature*.