

Universitat de Lleida
Facultat de Medicina

Trabajo de investigación

El té verde y su influencia en la absorción de glucosa y daño oxidativo en
intestino delgado

Grado de Nutrición Humana y Dietética



Autor: Cristian Vicens Martínez
Tutor: José Serrano Casasola
Fecha: Septiembre de 2014

**EL TÉ VERDE Y SU INFLUENCIA EN LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA Y DAÑO
OXIDATIVO EN INTESTINO DELGADO**



Trabajo Final de Grado presentado por: Cristian Vicens Martínez

Tutorizado por: José Serrano Casasola

ÍNDICE

1. Resumen.....	pág. 4
2. Introducción.....	pág. 7
2.1. Descripción del centro.....	pág. 7
2.2. Antecedentes.....	pág. 7
2.2.1. Glucosa y su metabolismo.....	pág. 7
2.2.2. Capacidad antioxidante.....	pág. 10
2.2.3. Té verde.....	pág. 12
2.2.4. NRF2.....	pág. 14
3. Hipótesis.....	pág. 15
4. Objetivos.....	pág. 15
4.1. Objetivo general.....	pág. 15
4.2. Objetivos específicos.....	pág. 15
5. Material y métodos.....	pág. 16
5.1. Cuantificación de proteínas en tejidos.....	pág. 16
5.2. Separación de proteínas.....	pág. 18
5.3. Capacidad antioxidante en tejidos.....	pág. 22
6. Resultados y discusión.....	pág. 25
6.1. Capacidad antioxidante.....	pág. 25
6.2. Daño oxidativo.....	pág. 26
6.3. NRF2.....	pág. 27
6.4. GLUT2.....	pág. 28
7. Conclusiones.....	pág. 30
8. Bibliografía.....	pág. 31

1. RESUMEN

Este trabajo es una continuidad del estudio realizado del efecto del té verde en la activación del AMPK cuyo objetivo fue determinar si el mecanismo de acción de los polifenoles podría estar relacionado con una modulación en la absorción de energía y el metabolismo, y cambios mitocondriales inducidos. El objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto del té verde en la absorción de glucosa y daño oxidativo en intestino delgado en un modelo in vivo en ratones C57BL6. Para evaluar los efectos del té verde en la absorción de carbohidratos se evaluó el contenido de transportadores de glucosa como marcadores de absorción a nivel intestinal. Adicionalmente se evaluó los efectos del té verde en la capacidad antioxidante y daño oxidativo a nivel intestinal mediante biomarcadores y cuantificación de NRF2. En los resultados se observaron diferencias entre los géneros. Se observó en las hembras una disminución de los transportadores de glucosa acompañado de un incremento del factor NRF2 y una disminución del daño oxidativo en el grupo tratado con té verde. Se puede concluir que el té verde incrementa la translocación de NRF2 al núcleo y que a su vez activan sistemas de detoxificación que pueden estar asociados a la disminución en el contenido de transportadores de glucosa GLUT2.

Aquest treball és una continuïtat de l'estudi realitzat de l'efecte del té verd en l'activació del AMPK l'objectiu el qual va ser determinar si el mecanisme d'acció dels polifenols podria estar relacionat amb una modulació en l'absorció d'energia i el metabolisme, i canvis mitocondrials induïts. L'objectiu principal d'aquest treball es determinar l'efecte del té verd en l'absorció de glucosa i dany oxidatiu en intestí prim en un model in vivo en ratolins C57BL6. Per avaluar els efectes del té verd en l'absorció de carbohidrats es va avaluar el contingut de transportadors de glucosa com marcadors d'absorció a nivell intestinal. Addicionalment es va avaluar l'efecte del té verd en la capacitat antioxidant i dany oxidatiu a nivell intestinal mitjançant biomarcadors i quantificació de NRF2. En els resultats es van observar diferències entre els gèneres. Es va observar a les femelles una disminució dels transportadors de glucosa acompanyat d'un increment del factor NRF2 i una disminució del dany oxidatiu en el grup tractat amb té verd. Es pot concloure que el té verd incrementa la translocació de NRF2 al nucli i que al seu torn activen sistemes de detoxificació que poden estar associats a la disminució del contingut de transportadors de glucosa GLUT2.

This work is a continuation of the study of the effect of green tea in the activation of AMPK whose objective was to determine if the mechanism of action of polyphenols may be related to a modulation in the energy absorption and metabolism, and induced mitochondrial changes. The main objective of this work is to see the effect of green tea on glucose uptake and oxidative damage in the small intestine in an in vivo model in C57BL6 mice. To evaluate the effects of green tea on the absorption of carbohydrates content of glucose transporters as markers of intestinal absorption level was evaluated. Additionally the effects of green tea in antioxidant capacity and oxidative damage in the intestine by NRF2 and quantification of biomarkers was evaluated. The results gender differences were observed. Decreased glucose transporters accompanied by a factor NRF2 increased and decreased oxidative damage in the group treated with green tea was observed in females. It can be concluded that green tea may increase of NRF2 translocation to the nucleus and which in turn activate detoxification systems that can be associated with the decrease in the content of glucose transporter GLUT2.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes

2.1.1. Glucosa y su metabolismo

La glucosa es el principal sustrato energético y para su absorción se requiere una proteína transportadora que se encuentra en la membrana celular. Hay dos tipos de transportadores, los transportadores activos de sodio y glucosa llamados SGLT y los transportadores pasivos de glucosa llamados GLUT.

Los SGLT utilizan un transporte acoplado, en este caso sodio junto con glucosa (o galactosa en algunos casos). Se localizan en la membrana luminal de las células epiteliales encargadas de la absorción (intestino delgado) y la reabsorción (túbulo contorneado proximal) de nutrientes. Se aprovecha el ingreso de sodio a favor de gradiente electroquímico, del exterior al interior generando energía que será la encargada de hacer entrar la glucosa en contra de gradiente hacia el interior de la célula. Se han identificado varios transportadores SGLT que se diferencian en: la afinidad por la glucosa y el sodio, el grado de inhibición frente a la florizina (una sustancia de las raíces de los manzanos que inhibe el SGLT2 aunque también inhibe parte del SGLT1 con lo que causa diarrea osmótica), la capacidad para transportar glucosa o galactosa y la ubicación de este transportador. Los principales son el SGLT1 y SGLT2 (Tabla 1). Aun así existen más transportadores (Tabla 2), aunque alguno de ellos no se determina la ubicación como por ejemplo el SGLT3 (Díaz, 2002; Brown, 2012; Pérez, 2010).

Tabla 1. Comparación de los transportadores SGLT1 y SGLT2

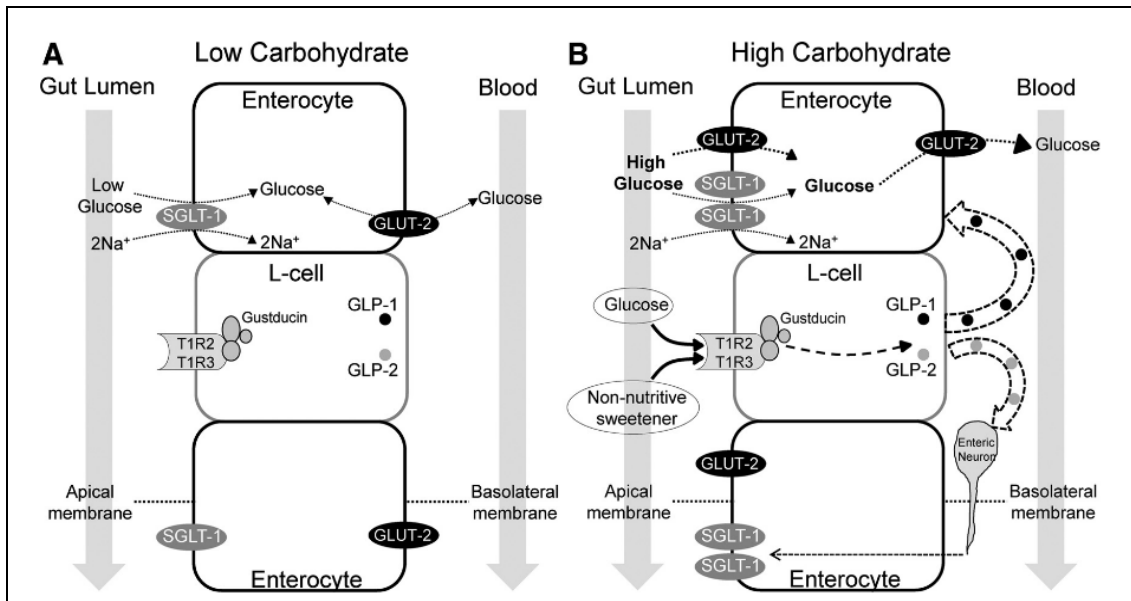
	SGLT1	SGLT2
Localización	Intestino delgado y riñón	Riñón
Sustratos	Glucosa o galactosa	Glucosa
Afinidad por la glucosa	Alta	Baja
Capacidad de transporte de glucosa	Baja	Alta
Función	- Absorción intestinal de glucosa y galactosa - Reabsorción renal de glucosa	Reabsorción renal de glucosa

Tabla 2. Familia de cotransportadores sodio-glucosa

Transportador	Sustrato	Distribución tisular
SGLT1	Glucosa y galactosa	Riñón , intestino delgado, corazón y tráquea
SGLT2	Glucosa	Riñón
SGLT3	Sensor de glucosa	Intestino delgado, tiroides, testículos, útero y pulmón
SGLT4	Manosa, glucosa, fructosa, galactosa y 1,5-AG	Riñón , intestino delgado, hígado, estómago y pulmón
SGLT5	Glucosa y galactosa	Riñón
SGLT6	Mio-inositol, glucosa, xilosa y quiro-inositol	Riñón , intestino delgado, médula espinal y cerebro

Los GLUT son similares en relación a su conformación proteica y presentan un sitio de glicosilación en la región externa de la membrana con partes hidrofílicas e hidrofóbicas formando el poro y permitiendo el paso de monosacáridos. Su mecanismo de acción se basa en un gradiente de concentración donde la glucosa se une a la proteína cambiando ésta de conformación, liberando la glucosa en el citoplasma y volviendo a su estado inicial. Se han identificado 13 diferentes. Vamos a resaltar el GLUT2, que tiene muy poca afinidad para la glucosa, además de transportar galactosa y fructosa. Se expresa en células pancreáticas, intestinales, hepáticas y túbulos renales. Su actividad aumenta respecto más glucosa haya en sangre (Díaz, 2002).

En el siguiente esquema se puede observar un modelo sobre la absorción intestinal de glucosa en bajo estado de hidratos de carbono y después de hacer una ingesta con alto contenido en éstos. En bajo contenido de hidratos, la mayoría de glucosa se transporta a través del SGLT1, aunque también puede pasar por el GLUT2 de forma bidireccional dependiendo de la cantidad de glucosa y las necesidades metabólicas de la célula intestinal. En alto contenido de hidratos, la glucosa se une a los receptores de dulzor iniciando una cascada de reacciones que liberan GLP-1 y GLP-2 (Brown, 2012).



GLP-1 es una hormona con carácter de incretina que contribuye al control de la homeostasis de la glucosa. Tiene acción insulínica e insulínica. Sus efectos son anabólicos sobre el metabolismo hepático de la glucosa en rata y hombre. También induce saciedad, y en el tejido adiposo su acción es lipolítica y lipogénica. En condiciones normales, después de ingerir hidratos de carbono y grasas, aumenta y estimula la secreción de insulina e inhibe el glucagón. Actualmente está considerado como posible tratamiento terapéutico en la diabetes tipo 2 (Valverde, 2006).

Los edulcorantes no nutritivos, llamados artificiales, también pueden interactuar con los receptores que se encuentran en las células intestinales. Para entender su mecanismo, primero vamos a hacer una pequeña introducción. En la lengua se encuentran tres variedades de papilas gustativas: fungiformes, foliadas y circunvaladas. Los distintos sabores tienen vías de señalización diferentes, por ejemplo el dulce, amargo y umami son detectados mediante receptores del gusto acoplados a proteínas G en células receptoras gustativas ubicadas en las papilas y otras zonas de la orofaringe. Estos tres son receptores heterodiméricos. Muchos productos químicos, incluidos los edulcorantes artificiales, pueden reaccionar con estos receptores (Brown, 2012; Smith, 2001).

Algunos edulcorantes no nutritivos como la sucralosa son capaces de estimular y regular hormonas como GLP-1 y GIP, o bien incrementar los transportadores de las células intestinales (Brown, 2012).

2.2.2. Capacidad antioxidante

En nuestro organismo existen muchas defensas antioxidantes, es decir, cualquier mecanismo y/o sustancia que impide, retarda, elimina o protege contra los efectos perjudiciales de la oxidación. Hay 3 líneas de defensa, la primera es la susceptibilidad de las macromoléculas en ser oxidadas (los más susceptibles son los aminoácidos sulfurados como la metionina y cisteína, la guanina de los ácidos nucleicos, y los ácidos grasos con más número de insaturaciones). La segunda línea de defensa son las sustancias que se encargan de contrarrestar los ROS oxidándose ellos, con lo que se encuentran antioxidantes enzimáticos, antioxidantes no enzimáticos y proteínas preventivas. Y la tercera son sistemas que se encargan de reparar el daño causado por la oxidación, ya sea revirtiendo moléculas oxidadas a reducidas o bien eliminándolas. Nosotros nos vamos a centrar en los antioxidantes no enzimáticos, que son los siguientes:

- Hidrofílicos
 - Glutación
 - Tioredoxina
 - Ácido ascórbico
- Lipofílicos
 - Carotenoides
 - Tocoferoles

Además de éstos, también contamos con enzimas antioxidantes como las glutatión peroxidasas, la SOD y muchas más que, junto con los antioxidantes anteriores, ayudan a proteger al organismo de los efectos perjudiciales de la oxidación.

El balance redox puede considerarse como un equilibrio entre la defensa antioxidante, que incluye los componentes descritos previamente; y el daño oxidativo. Existen

métodos para poder determinar el daño oxidativo que tienen los tejidos, junto con los cuales sería factible determinar el balance redox de una célula o tejido. Existen varios biomarcadores celulares de oxidación, las cuales son en su mayoría moléculas formadas por la oxidación, es decir, macronutrientes que han reaccionado con los reactivos de primera generación (ROS) y se forman los de segunda generación (llamados compuestos carbonílicos), mucho más estables y más peligrosos ya que pueden durar más tiempo y dañar otros tejidos. En la oxidación de proteínas existen tres marcadores: CEL (carboxietil lisina), MDAL (malondialdehid lisina) y CML (carboximetil lisina). Cuando se detecta alguno de estos marcadores, significa que existe cierto grado de lesión proteica o de daño oxidativo derivada de los productos de oxidación de la glicoxidación (en caso de CEL), lipoxidación (MDAL) o bien de los dos (CML, un marcador mixto de lesión). Estos marcadores aumentan con la edad, lo cual significa que disminuye la longevidad de la especie ya que podrían servir como marcadores de mayor grado de oxidación. Aún así hay muchos factores que intervienen en la longevidad de una especie, como podrían ser los polifenoles del té verde.

Existen varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra. Una de las estrategias más utilizadas in vitro consiste en determinar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (DPPH, ABTS, DMPD, DMPO y FRAP). Son utilizados para captar radicales libres generados, operando así en contra de los efectos perjudiciales de la oxidación de los ROS. Sin embargo, estos métodos dan sólo una idea de lo que pasaría in vivo. Los métodos más aplicados son el DPPH y ABTS. Presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones aunque hay diferencias entre ellos.

Para nuestro caso, hemos utilizado el ABTS, un radical libre que presenta un color verde intenso que se puede obtener a partir de una reacción química, enzimática o electroquímica. Es capaz de medir compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. Además presenta máximos de absorbanza a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski, 2005).

2.2.3. Té verde

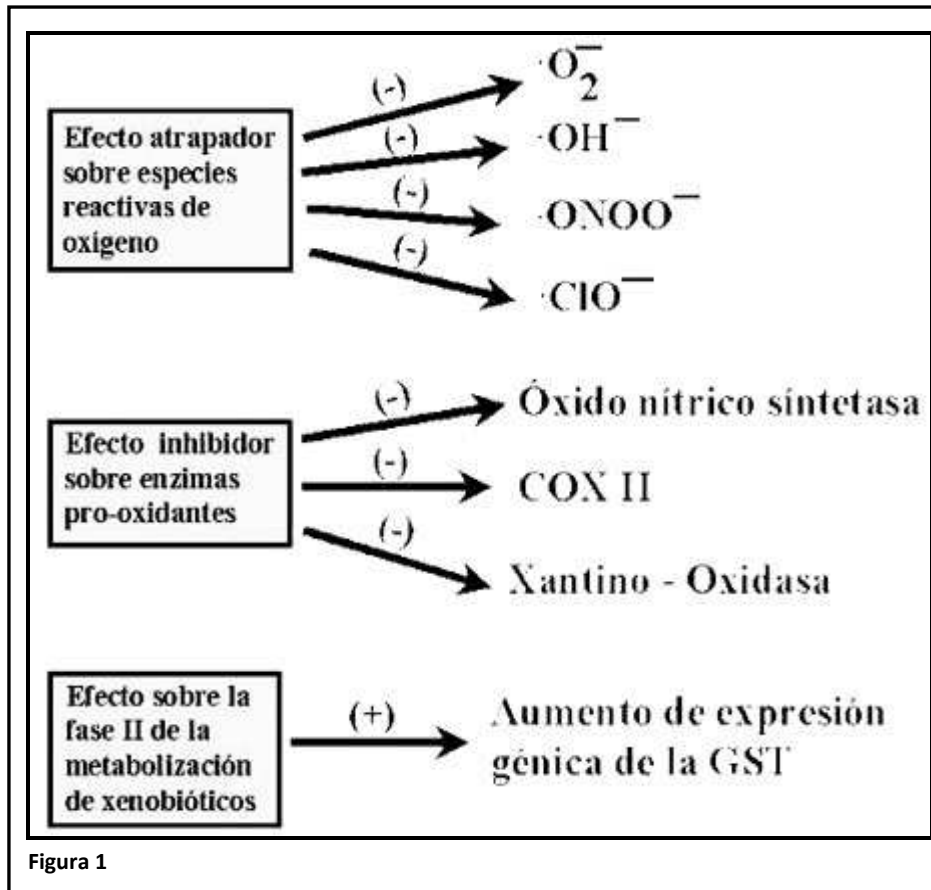
El té verde es originario de China y Japón, se prepara por secado rápido de las hojas recién cosechadas. Algunas de las acciones en salud son: la disminución del catabolismo de las catecolaminas, efecto antiinflamatorio, actuar como antioxidante por sus compuestos, acción hipocolesterolémica, la inhibición del crecimiento de células malignas previniendo el cáncer por su acción inhibitoria sobre la carcinogénesis (Funosas, 2005). Los compuestos fenólicos, contenidos en el té, son sustancias que solo se encuentran en el reino vegetal (los humanos no son capaces de sintetizarlos). Se conocen más de 8000 y se localizan en las raíces, hojas, tallos, troncos y frutos. Se caracterizan por poseer, como mínimo, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. Se forman en el metabolismo secundario de las plantas y están involucrados en la protección de éstas contra las radiaciones UV y la agresión de los patógenos (Naudí, 2014).

El té verde contiene, en sus hojas frescas, una alta cantidad de flavanoles (un tipo de flavonoides) conocidos como catequinas. Son los más abundantes, representando el 30% del peso seco. Las principales catequinas presentes en el té son la epicatequina (EC), la epigallocatequina (EGC), la epicatequina gallato (ECG) y la epigallocatequina gallato (EGCG), siendo esta última uno de los principales polifenoles y que ha demostrado efectos pleiotrópicos sobre las proteínas celulares y vías de señalización, por eso mismo hace que sea la que más interés haya en su investigación. También contiene otros flavonoides como la quercetina, miricetina y el kanferol, entre otros (Neves, 2010; Serrano, 2013; Valenzuela, 2004).

Numerosos estudios han demostrado que los polifenoles del té muestran un efecto antioxidante beneficioso para nuestro organismo. Además, los polifenoles del té verde son poderosos quelantes del hierro y del cobre, con lo cual pueden evitar los efectos pro-oxidantes de estos metales cuando se encuentran fisiológicamente en estado libre (no unidos a proteínas). También son capaces de inhibir la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa, disminuyendo de esta manera la probabilidad de formación del ONOO^- y sus efectos prooxidantes, y otras enzimas relacionadas también con la oxidación. Y por último, también tienen un efecto protector sobre nuestro organismo aumentando la expresión de la GST (Glutathión S-Transferasa) en el hígado y así mejorar la capacidad de detoxificación de xenobióticos, principalmente los que tienen actividad

pro-carcinogénica. De esta forma, este es otro mecanismo mediante el cual los componentes del té pueden ejercer su efecto protector.

En la figura 1 se muestran resumidas todos los efectos protectoras de las catequizas y polifenoles del té (Valenzuela, 2004).



La habilidad de un compuesto para atrapar los radicales libres está determinada por el potencial redox, un valor medido en mV el cual cuanto mayor sea, más poder antioxidante tiene esa sustancia. En la figura 2 se muestran algunas sustancias antioxidantes fisiológicas comparadas con las del té (Valenzuela, 2004).

Antioxidante	Potencial Redox (mV)
Ascorbato	280
α -Tocoferol	480
Ácido úrico	590
Glutación	920
EGCG	430
EGC	430
EC	570
ECG	550
Teaflavina	520
Tearrubigina	540

Figura 2

2.2.4. NRF2

Es un factor de transcripción, sensible al estado redox celular clave en inflamación y carcinogénesis, que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas de detoxificación y antioxidantes, mediante una unión a una secuencia de ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés "Antioxidant Response Element"). Junto con Nrf1, están implicados en esta regulación. Su principal función es la activación de los sistemas de detoxificación propios del organismo. La evidencia recogida por diversos estudios sugiere que NRF1 y NRF2 median la adaptación celular al estrés oxidativo a través de esta regulación. Se sugiere que NRF2 provoca también la inducción enzimática para la quimiopreención del cáncer aunque aún se desconocen todos sus mecanismos y los genes relacionados en su proceso (McMahon, 2001; Königsberg, 2007)

Su origen está relacionado con la proteína NF-E2, que en el de ratón contiene 373 aminoácidos y una masa molecular aproximadamente de 45 kDa. Esta proteína se expresa únicamente en células del tipo eritroide o megacariocitos. La presencia de NRF2 no es esencial para la eritropoyesis, el crecimiento o desarrollo. Aun así, sin este factor no se inducen los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinogénicos, de protección contra el estrés oxidativo y de los xenobióticos (ya que contribuye a la actividad de proteosoma 26S).

3. HIPÓTESIS

Se ha observado que la ingesta de té verde induce una disminución en el daño oxidativo tisular en un modelo animal de ratones. Una de las hipótesis planteadas a partir de este estudio es que la disminución en el daño oxidativo podría estar relacionada a una menor disponibilidad energética a nivel celular. En ese sentido, en este trabajo se postula la hipótesis que la ingesta de té verde induce una disminución de transportadores de GLUT2 a nivel intestinal a través de una menor capacidad de respuesta del organismo para en la activación de los sistemas de detoxificación contra los efectos del daño oxidativo implicados en la síntesis de GLUT2.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto del té verde en la absorción de glucosa y daño oxidativo en intestino delgado en un modelo in vivo en ratones C57BL6

4.2. Objetivos específicos:

- Cuantificación del transportador GLUT2 en homogenizado de intestino delgado por medio de la técnica de Western Blot.
- Cuantificación del factor de transcripción NRF2 en homogenizado de intestino delgado por medio de la técnica de Western Blot.
- Determinación del daño oxidativo en homogenizado de intestino delgado por medio de biomarcadores de glicooxidación (CML) utilizando la técnica de Western Blot.
- Determinación de la capacidad antioxidante en homogenizado de intestino delgado por medio de la técnica del ABTS.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El siguiente experimento proviene de la continuación del estudio realizado en ratones expuestos a una dieta control frente una dieta con té verde durante tres meses, para observar posibles cambios en la absorción de energía y el metabolismo. En el grupo intervención se sustituyó el agua de bebida por té verde, aunque no hubo diferencias de ingesta en cuanto a ingesta de bebida ni en la dieta de los ratones. Al finalizar los tres meses se les realizó diferentes pruebas de glucosa e insulina, y una semana más tarde fueron sacrificados para recolectar las muestras de sangre y demás tejidos. Posteriormente, para este trabajo se han utilizado muestras de intestino delgado.

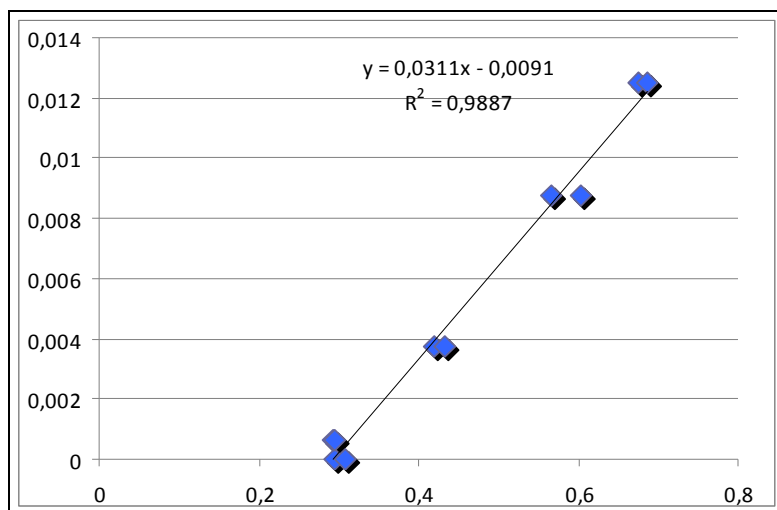
5.1. Cuantificación de proteínas en tejidos

Se han cogido las muestras de intestino delgado de ratones que habían tenido una dieta con té verde frente una dieta control y se han separado por dieta y género obteniendo un total de 38 muestras. Las muestras han sido guardadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y puestas en hielo cuando se trabajaron con ellas. Se ha cortado aproximadamente 20 mg de intestino delgado y se le ha añadido 300 μl de tampón de homogenizado. El tampón de homogenizado preparado, contiene KCl 180 mM (6.72 g para 500 ml), MOPS 5 mM (0.52 g para 500 ml), EDTA 2mM (0.372 g para 500 ml) y DTPAC 1 mM (0.196 g para 500 ml).

Primero se pipetea 8 ml de tampón de homogenizado en beaker y se agregan:

- 0.8 de solución de BHT 10 mM en metanol (es un antioxidante para evitar posibles oxidaciones).
- 10 de Na_3VO_4 800 mM.
- 16 de NaF 500 mM. (Junto con el Na_3VO_4 se utiliza para inhibir las fosfatasas)
- 80 de inhibidor de proteasas.

Una vez añadido el tampón, se homogeniza bien para destruir las paredes del tejido y poder cuantificar las proteínas posteriormente. Para la cuantificación de proteínas se preparó una recta patrón de BSA (Albúmina sérica) haciendo 6 diluciones de 0, 0'000625, 0'00375, 0'00875, 0'0125 y 0'025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



[En el eje de las X se muestra la absorbancia y en el de las Y la concentración de albúmina sérica]

El reactivo de Bradford tiene una coloración rojiza que en contacto con proteínas se vuelve de color azul. Se realizó una dilución 1:30 (5 μ l de muestra con 145 μ l de agua milli-Q) con las muestras ya que estaban muy concentradas. Luego hemos añadido las muestras por triplicado en una microplaca con la recta patrón. Se ha cogido 3 μ l de muestra de cada dilución con 157 μ l del agua. A continuación hemos añadido el Bradford, hemos homogeneizado y esperado 10 minutos antes de hacer la lectura al espectrofotómetro. Finalmente se leyó la absorbancia a 595 nm.

En la siguiente tabla hay las concentraciones originales de las distintas muestras.

Muestras	Concentración de la muestra original			MEDIA	D.E.	Error
TF1	9,165696	13,543584	11,814048	11,507776	2,20	19,16
TF2	21,380544	23,056032	22,245312	22,227296	0,84	3,77
TF3	8,24688	9,59808	8,192832	8,679264	0,80	9,17
TF5	16,08384	19,380768	18,299808	17,921472	1,68	9,38
TF7	7,652352	8,949504	9,32784	8,643232	0,88	10,17
TF8	7,544256	8,24688	8,841408	8,210848	0,65	7,91
TF9	9,32784	10,246656	9,706176	9,760224	0,46	4,73
TF10	22,893888	23,488416	23,326272	23,236192	0,31	1,32
TF11	15,651456	20,13744	18,894336	18,227744	2,32	12,71
CM1	19,59696	20,461728	20,786016	20,281568	0,61	3,03
CM2	6,735424	6,1184	5,998976	6,28426667	0,40	6,29
CM3	10,624992	11,868096	11,381664	11,291584	0,63	5,55
CM4	9,976416	11,814048	11,597856	11,12944	1,00	9,02
CM5	14,570496	7,328064	8,354976	10,084512	3,92	38,86
CM6	20,083392	10,246656	12,786912	14,37232	5,11	35,53
CM7	17,597184	9,165696	10,733088	12,498656	4,48	35,88

CF1	6,158208	5,839744	5,461568	5,81984	0,35	5,99
CF2	9,382656	9,163712	8,845248	9,13053867	0,27	2,96
CF3	3,436608	3,706848	4,46352	3,868992	0,53	13,76
CF4	3,33184	3,650304	3,112896	3,36501333	0,27	8,03
CF5	2,73472	2,794432	2,555584	2,694912	0,12	4,61
CF6	3,092992	3,073088	2,714816	2,96029867	0,21	7,19
CF7	5,004	6,3552	6,030912	5,796704	0,71	12,17
CF8	17,70528	16,462176	19,705056	17,957504	1,64	9,11
CF9	11,327616	11,814048	12,138336	11,76	0,41	3,47
CF10	12,786912	14,408352	12,408576	13,20128	1,06	8,05
CF11	9,489984	10,192608	11,057376	10,246656	0,79	7,66
TM1	14,084064	16,245984	16,732416	15,687488	1,41	8,99
TM2	9,814272	13,759776	11,705952	11,76	1,97	16,78
TM3	9,922368	10,462848	11,48976	10,624992	0,80	7,49
TM4	17,489088	19,488864	19,705056	18,894336	1,22	6,47
TM5	15,381216	15,975744	16,08384	15,8136	0,38	2,39
TM6	12,624768	14,678592	14,354304	13,885888	1,10	7,95
TM7	18,299808	20,67792	21,056256	20,011328	1,49	7,47
TM8	21,326496	21,704832	23,218176	22,083168	1,00	4,53
TM9	15,381216	15,110976	15,27312	15,255104	0,14	0,89
TM10	6,787584	8,24688	8,463072	7,832512	0,91	11,64
TM11	22,137216	16,732416	18,299808	19,05648	2,78	14,59

TM: Té-Machos TF: Té-Femelles CM: Control-Machos CF: Control-Femelles

5.2. Separación de proteínas

La electroforesis es un método de migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico. Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos – y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Hilda, 2000). La electroforesis de proteínas en geles en una matriz de poliacrilamida es sin duda una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método rápido y económico a nivel de muestra pues solo se requieren cantidades muy pequeñas de proteínas (microgramos). La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. A más carga por unidad de masa sea, más rápida será la migración. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica. Los geles se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente "cross-linking", la bis-acrilamida, i en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se utiliza TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) como catalizador el ión persulfato que se añade en forma de

persulfato de amonio (PA). El % total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. La mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 – 10 %. Un menor % (mayor tamaño de los poros) es mejor para separar proteínas de gran tamaño. Hay dos tipos de electroforesis pero la más común es la desnaturizante, donde se somete a las proteínas a la completa desnaturización con un detergente. En nuestro caso hemos utilizado la desnaturizante, donde el detergente más usado es el SDS (decilsulfato sódico), aniónico que confiere carga negativa a las proteínas. A la hora de preparar los geles, hay dos tipos, gel epilador y gel separador. El primer gel llamado también concentrador asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocando la acumulación de todas las que se han cargado en el pozo de la muestra, con la finalidad que todas empiecen la migración al mismo tiempo (Sanchis, 2011).

Hay geles de 15 o 10 pocillos. También hay que tener en cuenta:

- El Grosor
 - 0,75 mm
 - 1 mm
 - 1,5 mm
- El % de acrilamida
 - 7,5 % (prot. >100 Kdaltons)
 - 10 % (prot. 30 – 100 Kdaltons)
 - 15 % (prot. <30 Kdaltons)

Las proteínas de alto peso molecular se quedarán arriba. A más % de acrilamida, más cuesta de que pasen las proteínas. Hemos utilizado el de 10 % ya que GLUT2 se encuentra en un rango de 45 – 54 KDa.

El gel epilador se prepara con los siguientes reactivos en el siguiente orden:

- Agua (3,4 ml)
- Tris 0,5 M pH 8,9 (1,5 ml)
- Acrilamida/Bis 30 %
- SDS 10 % (60 µl)

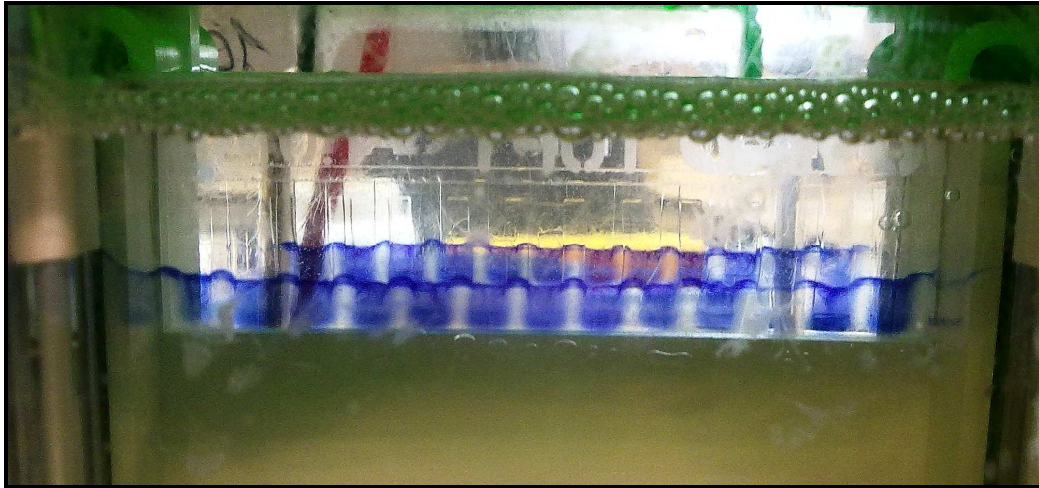
- PA 10 % (40 μ l)
- TEMED (7,5 μ l)

El gel separador 10 % se prepara con los siguientes reactivos en el siguiente orden:

- Agua (3,96 ml)
- Tris 1,5 M pH 8,9 (2,5 ml)
- Acrilamida/Bis 30 % (3,34 ml)
- SDS 10 % (100 μ l)
- PA 10 % (80 μ l)
- TEMED (7,5 μ l)

Una vez polimerizados los geles, los ponemos y que los peines estén enfrentados. Añadimos el buffer running (100 ml por cada litro de agua Milli-Q) hasta que quede todo cubierto. Desnaturalizamos las proteínas a 95°C durante 3 minutos y luego centrifugamos para que se vayan para el fondo los posibles restos de tejido, colágeno y demás. Pipeteamos de la parte superior 20 μ l. A la hora de añadir a los pocillos, lo hacemos de forma suave e ir soltando poco a poco de abajo hacia arriba sin apretar bruscamente ni salirse demasiado rápido.

En el primer pozo ponemos el Magic Mart que no se ve a simple vista (1 μ l) para dar el peso molecular de las proteínas y el Rainbow (5 μ l) para dar color. Cuando lo tengamos hecho, hay que proceder a la electroforesis propiamente dicha. Hay que dejar 1 h y 15 minutos o más tiempo a 30 miliAmpers (15 por membrana) para que se puedan correr bien las proteínas. Éstas se separan de positivo (ánodo) a negativo (cátodo).



Pasado este tiempo, cogemos las membranas y las dejamos puestas con MetOH agitándose para que se activen. Hay que preparar otra cubeta y un tampón de transferencia, llamado Transfer.

Para preparar el Transfer:

- 10 % de transfer
- 20 % MetOH
- Resto agua Milli-Q

Ya se pueden quitar los geles, con mucho cuidado que no se rompan. El gel epilador se elimina. El otro se coloca por la parte que esté en contacto con la membrana y se cierra dentro los cartones y las esponjas, asegurando que no haya burbujas con la ayuda de un rodillo.

Agregamos el transfer a las membranas y al recipiente, hasta llenarlo del todo, nunca dejamos que las membranas queden sueltas, tienen que estar bien lubricadas para evitar que se sequen. Esperamos la transferencia durante 1 hora a 100 voltios.

Para el bloqueo, se utiliza proteína de leche (caseínas) y sirve para que no se quede pegado el anticuerpo a los laterales y los bordes del gel donde no hay proteína. Para el NRF2 se usó el I-block.

Para preparar el anticuerpo son unos 30 minutos hasta 60 y lo dejamos incubar toda la noche en un roler a 4 – 6 °C (entre 12-24 h). En función del tipo de proteína a cuantificar, usamos un tipo de anticuerpo u otro.

A continuación se hacen los lavados del anticuerpo utilizando el Trist con base salina, que se prepara con los siguientes reactivos:

- 10 ml Trist base 2 M
- 50 ml NaCl 2,5 M
- Agregar 1 l de TBST que contiene Tween (un detergente muy espeso que se corta la parte final de la punta para poder succionar y se deja en el recipiente.

Hacemos 4 lavados de TBST 0,05 % y uno último de BST sin Tween de 5 minutos cada uno (el número y tiempo de cada lavado puede variar, pero es mejor hacer muchos lavados de poco tiempo para eliminar lo máximo posible residuos de las membranas.

Después preparamos el anticuerpo Anti-Rabbit que es el a. secundario. Está a una concentración 1:50000 (0,8 µl por 40 ml TBST 0,05 %) y añadimos 20 ml de esta solución a cada membrana y dejamos esperar 60 minutos a una velocidad más tranquila que los lavados ya que nos interesa que se una el anticuerpo. Después de los 60 minutos repetir los lavados. Al terminar añadimos 1,5 ml de Luminol y 1,5 ml de peróxido de hidrógeno para dar luminiscencia con el anticuerpo y así poder identificar la franja. El anticuerpo tiene la enzima peroxidasa, cuando añadimos el Luminol y el peróxido, empieza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno y esto hace que se oxiden otros sustratos como proteínas que darán la luminiscencia.

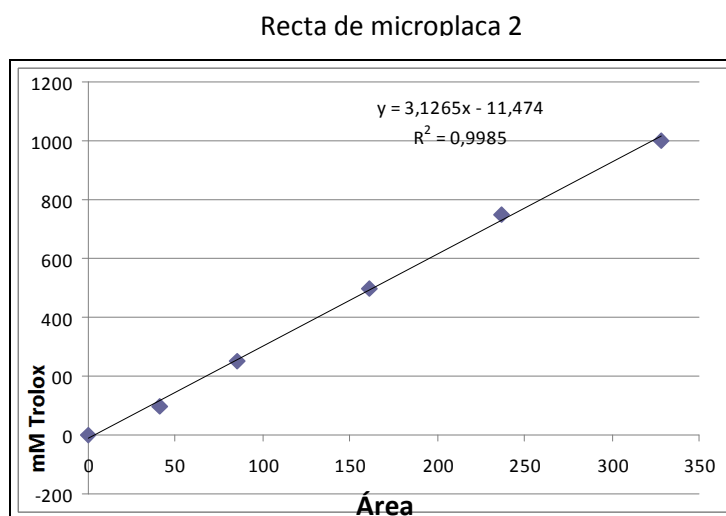
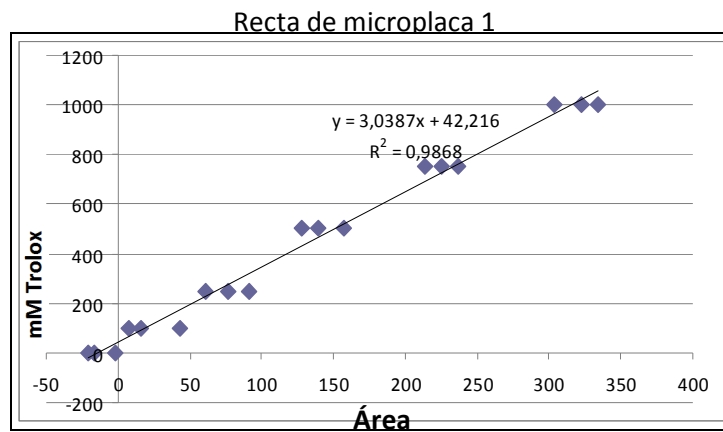
Entonces añadimos 1,5 ml al medio de cada tapa donde añadiremos las membranas haciendo que la parte de las proteínas queden en contacto con la solución. Dejar esperar 5 minutos y ponerlos encima de plástico acetato para poder leerlo posteriormente.

5.3. Capacidad antioxidante en tejidos

Se han cogido las muestras, comentadas anteriormente, en 2 microplacas para aplicar el método ABTS. La recta patrón ha sido realizada, una para cada microplaca, con las

siguientes concentraciones de trolox: 100, 250, 500, 750, 1000 mM. En este caso su medio de solución es el MetOH puro con una relación de 1 ml ABTS por 95 ml MetOH aunque se ha añadido un poco más del radical.

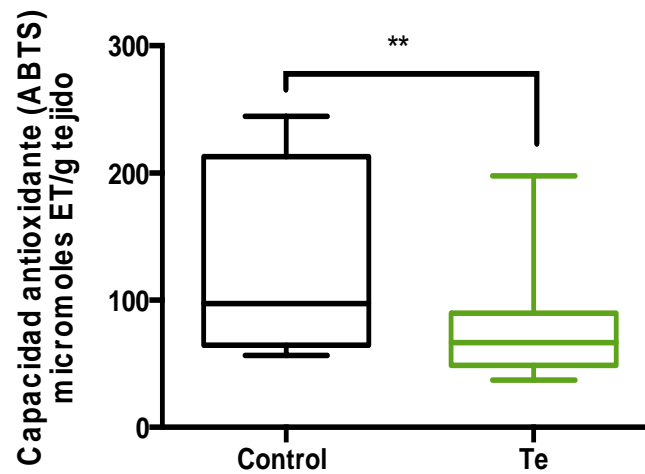
A continuación hay las dos rectas.



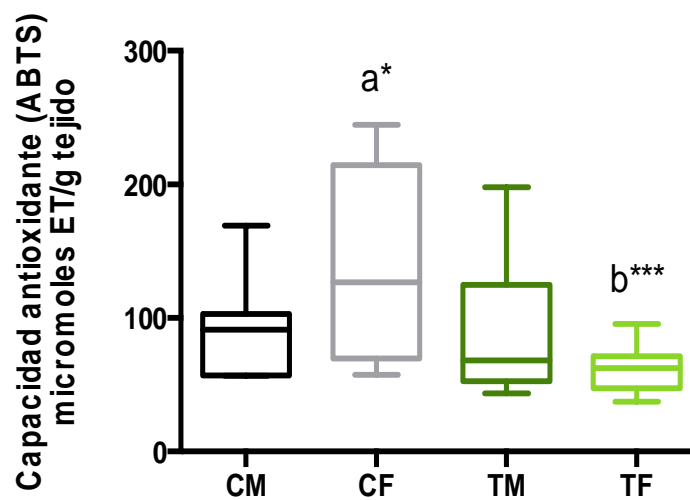
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Capacidad antioxidante

Se puede observar una clara diferencia en la capacidad antioxidante entre grupo intervención y control. Esta diferencia es estadísticamente significativa como se puede ver en la siguiente gráfica.

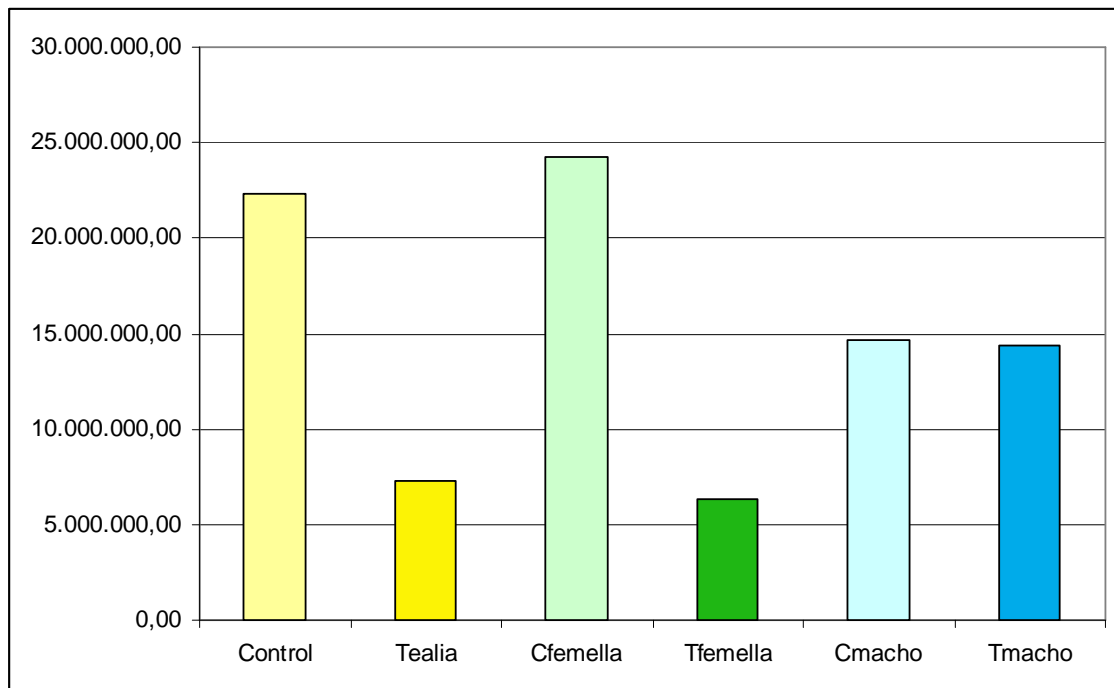


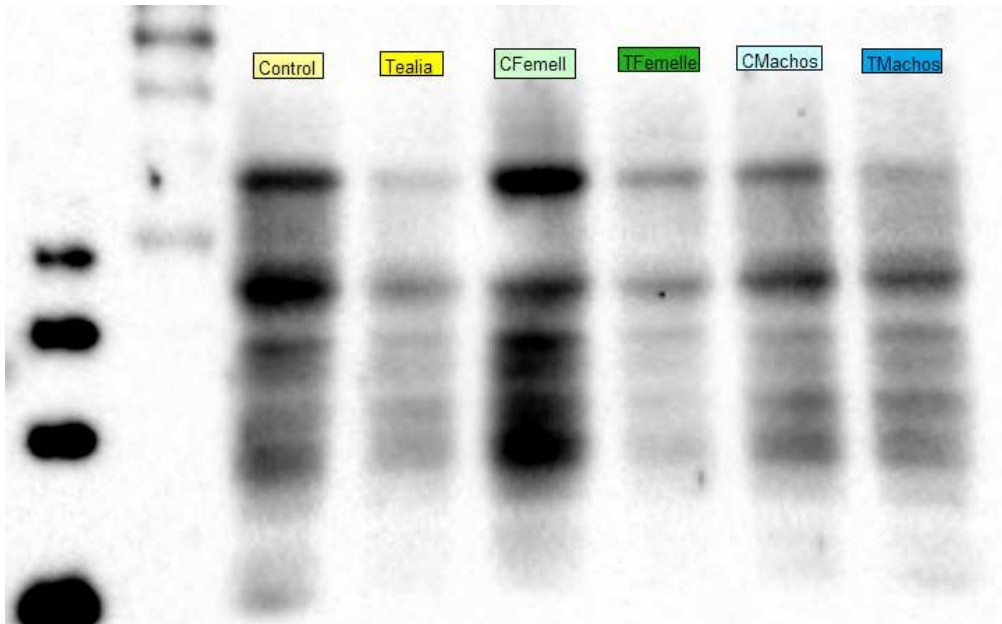
Pero esta diferencia es debida a los diferentes cambios que hay entre el grupo de las hembras y los machos. En la gráfica de abajo se puede observar claramente, en especial entre el grupo control e intervención de las hembras. En los machos no hay diferencias.



6.2. Daño oxidativo

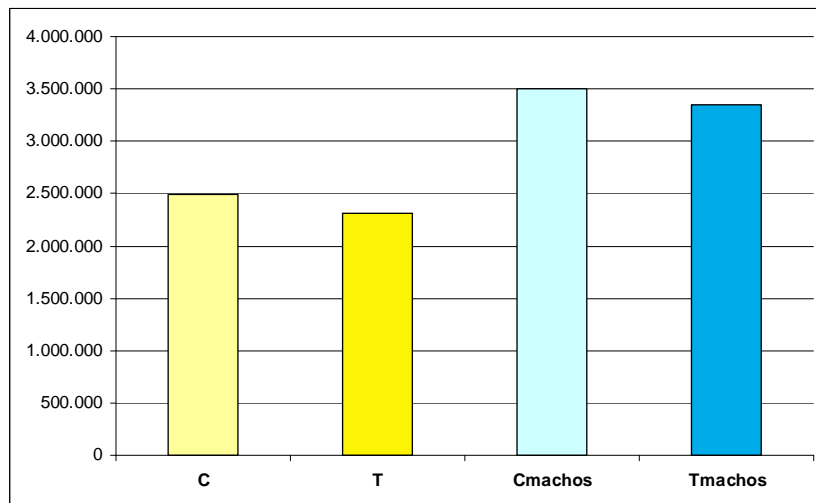
Sobre el daño oxidativo se puede observar diferencias entre los diferentes grupos. Hay una clara diferencia entre la dieta control vs dieta del té verde. El daño oxidativo está presente en los grupos controles, aunque hay que especificar que es debido a las hembras, ya que en los machos no hay diferencia alguna entre los dos grupos. Esto podría suponer que la ingesta de los polifenoles del té en los machos no presenta ningún beneficio desde el punto de vista de la oxidación, deben tener algún mecanismo que por muchos antioxidantes que consuman, su cuerpo no los aprovecha y no causa ningún efecto. En cambio, en las hembras se ve una gran diferencia respecto al control. Como se ha comentado anteriormente, tanto la capacidad antioxidante como el daño oxidativo, solo se observan cambios en las hembras, pues muestran una mejora respecto a la oxidación. En cambio, los machos no presentan ningún cambio. Se desconoce el motivo pero está claro que una ingesta de polifenoles en ellos no presenta mejora en las células intestinales.

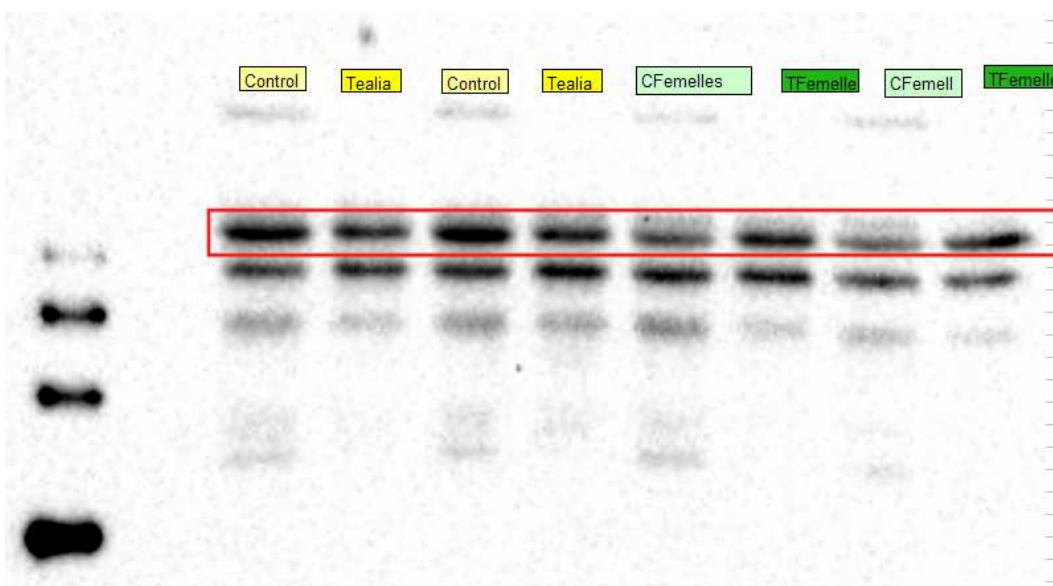
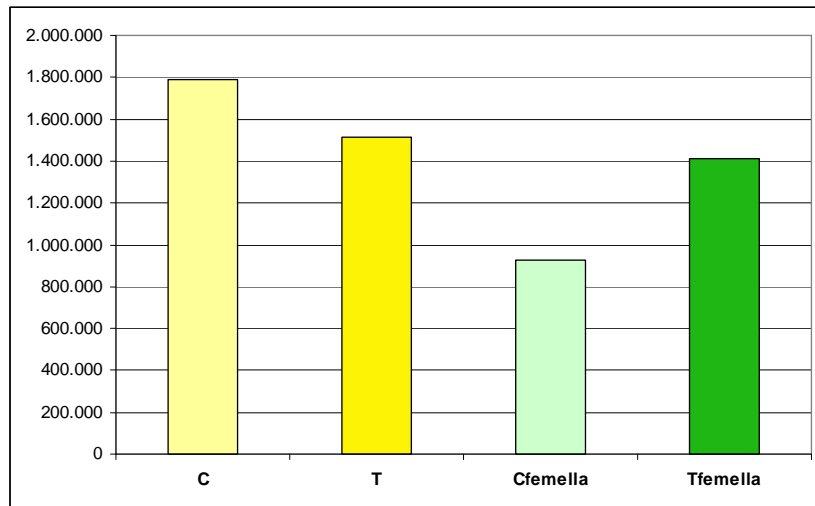




6.3. NRF2

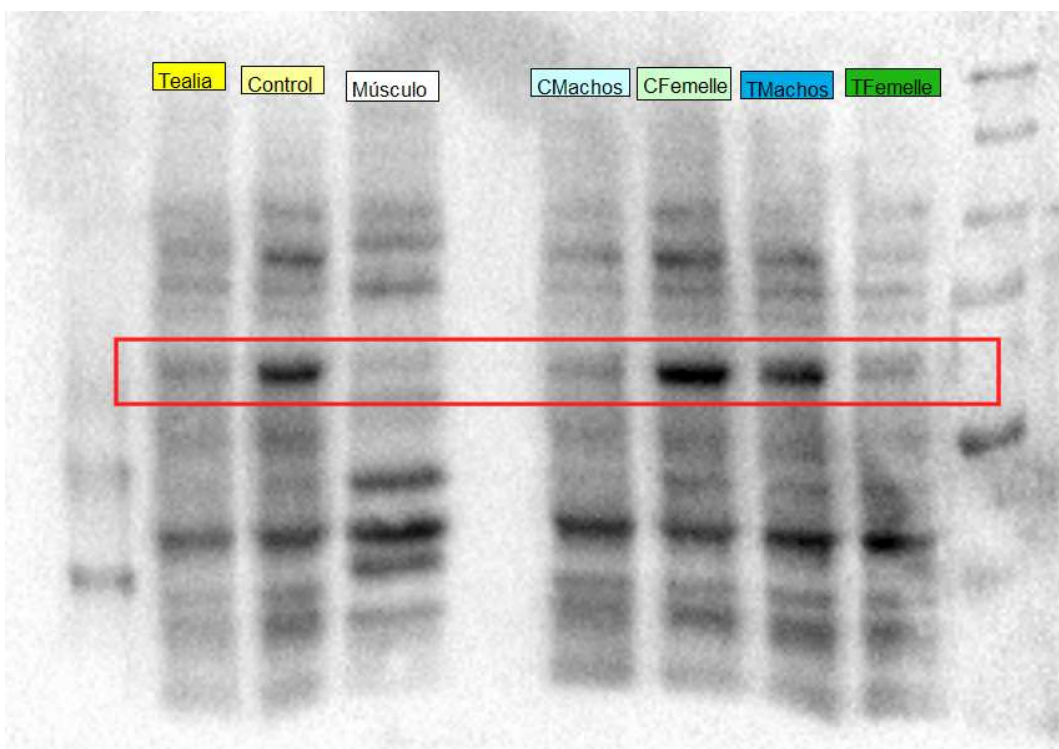
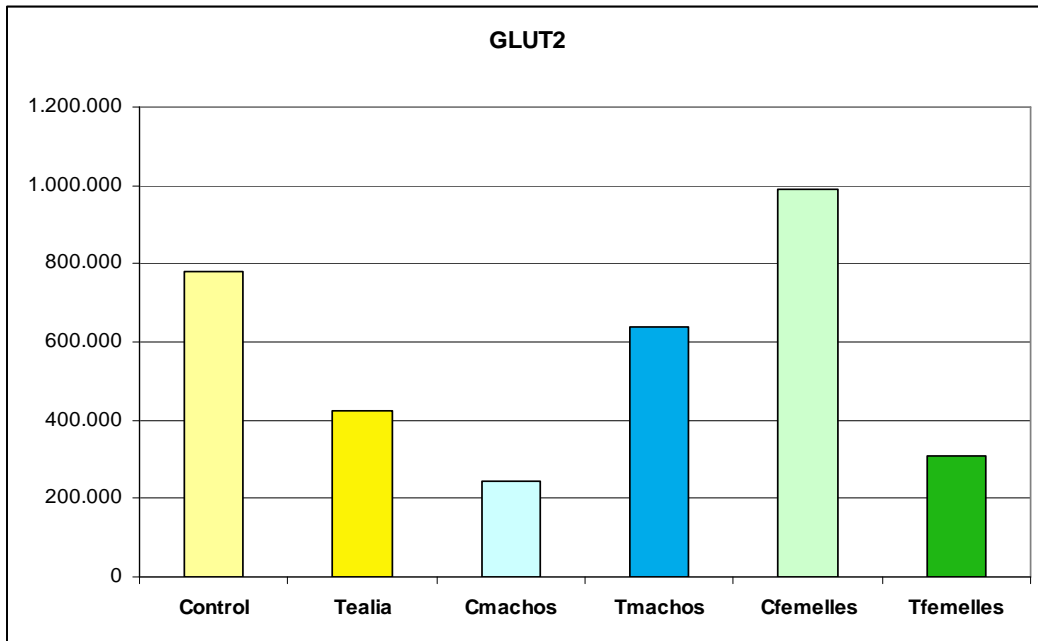
Se puede observar en las siguientes gráficas que apenas hay diferencias entre los machos, pero sí en las hembras. Hay que especificar que uno es el de 57 KDa y el otro el de 100 KDa. Esto significa que del tiempo, el de 57 KDa se verá a los pocos segundos de exposición y que el de 100 KDa seguramente a los minutos de exposición.





6.4. GLUT2

Según se ve en la siguiente gráfica hay más transportadores en el grupo control que en el del té. Esto es debido al grupo de las hembras, en especial el control, obteniendo el valor máximo de transportadores, en cambio el grupo intervención está mucho más bajo. Los machos en cambio se comportan al revés.



Se desconoce la causa exacta de porqué sucede esto. Las hembras tienen más transportadores de glucosa que los machos pero está confirmado que el comportamiento en absorción de glucosa no es el mismo en las hembras que en los machos. Aun así, la ingesta de los polifenoles del té verde incrementan la capacidad antioxidante de las hembras y producen menos daño oxidativo, como era de esperar, aparte de incrementar el factor de transcripción NRF2 (por vías aun desconocidas). No obstante los transportadores de glucosa no parecen disminuir, todo lo contrario. Esto hace que se tenga que seguir estudiando el comportamiento de los transportadores de glucosa y averiguar qué factores están relacionados, por ejemplo los estrógenos entre ellos, los distintos transportadores en relación a los polifenoles y otras sustancias capaces de reaccionar como los edulcorantes artificiales, etc.

7. CONCLUSIONES

En relación al trabajo se puede decir que la cuantificación de transportadores de glucosa en células intestinales es muy variable en función del sexo y de la intervención. El tratamiento con té verde inhibe los transportadores de glucosa, pero en este caso solo se observa una disminución de éstos en el grupo de las hembras, en los machos hace un efecto contrario, aún así los machos, cuando son tratados con té, muestran insulinoresistencia mientras que las hembras no. Además tienen una mayor sensibilidad a nivel de intestino (curva de tolerancia oral) y menor sensibilidad a nivel sistémico (en sangre, curva subcutánea); y las hembras al revés, mayor sensibilidad en sistémico y menor en oral. Muchos estudios realizados explican que las hembras tienen menor incremento de glicemia versus los machos. Hay muchos factores que aun se desconocen pero por ejemplo los estrógenos se sabe que tienen un efecto protector relacionado con las células β del páncreas entre otras funciones.

También cabe destacar el efecto de los polifenoles del té verde en cuanto a la capacidad antioxidante. Las hembras, como hemos visto anteriormente a los resultados, son las que muestran una clara diferencia. Una posible hipótesis podría ser que cuando ingieren los polifenoles del té verde pierden capacidad antioxidante por parte de su organismo para ahorrar trabajo al mismo. En cambio, los machos parece ser que no muestran ningún efecto.

Por supuesto los polifenoles del té verde también juegan un papel muy importante en la vía del NRF2, incrementando la translocación de este factor para activar posteriormente los sistemas de detoxificación del propio organismo.

Y además los propios antioxidantes del té hacen que haya menos daño oxidativo dentro de las células intestinales, pero solamente en el grupo de las hembras. Por varias razones, aun desconocidas, no se observa ninguna mejora entorno al daño oxidativo en el grupo de los machos, como si no fuera efectivo el tratamiento con té verde.

8. BIBLIOGRAFÍA

Baba, T. et al. (2005). Estrogen, Insulin, and Dietary Signals Cooperatively Regulate Longevity Signals to Enhance Resistance to Oxidative Stress in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (16): 16417 – 16425.

Brown, R. J. (2012). Non-nutritive Sweeteners and their Role in the Gastrointestinal Tract. *J Clin Endocrinol Metab*, 97 (8): 2597 – 2605.

Chan, K. et al. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *PNAS*, 98 (8): 4611 – 4615.

Díaz, D. P. (2002). ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?. *IATREIA*, 15 (3): 179 – 186.

Funosas E. R. et al. (2005). Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica. *Avances en Odontoestomatología*, 21 (3): 2.

Hilda, M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG*, 1 (2): 31 – 41.

Königsberg, M. (2007). Nrf2: La Historia de un Nuevo Factor de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *REB*, 26 (1): 18 – 20.

Kuskoski, E. Marta et al. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25 (4): 726 – 732.

Le May, C. et al. (2006). Estrogens Project pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *PNAS*, 103 (24): 9232 – 9237.

McMahon, M. et al. (2001). The Cap 'n' Collar Basic Leucine Zipper Transcription Factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) Controls Both Constitutive and Inducible Expression of Intestinal Detoxification and Glutathione Biosynthetic Enzymes. *Cancer Res*, 61.

Naudi, A. (2014). Nutracèutics i envelliment; Tema 8 Aliments nutricèutics i envelliment: 6 – 7.

Naudi, A. (2014). Nutracèutics i envelliment; Tema 5 Els efectes de l'estrès oxidatiu: 17.

Neves, A. L. A. et al. (2010). Effects of green tea use on wound healing. *Int. J. Morphol*, 28 (3): 905 – 910.

Pérez, G. (2010). Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2): de la glucosuria renal familiar al tratamiento de la diabetes mellitas tipo 2. *Revista Nefrología*, 30 (6): 618 – 625.

Sanchis, D. (2011). Pràctica 2 Bioquímica i Metabolisme, Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida.

Serrano, J. (2013). Dietary intake of green tea polyphenols regulates insulin sensitivity with an increase in AMP-activated proteïna kinase α content and changes in mitochondrial respiratory complexes. *Mol. Nutr. Food Res*, 57, 459 – 470.

Smith, D. V. y Margolskee, R. F. (2001). El sentido del gusto. ¿Cómo identifica la lengua las sensaciones de dulce, salado, ácido y amargo? La ciencia está descubriendo las interpretaciones que realiza el cerebro de esas señales, traducidas en los distintos gustos. *Investigación y Ciencia*, 296: 67 – 69.

Valverde, I. (2006). El GLP-1: acción biológica y posibles efectos terapéuticos. *Endocrinol Nutr.* 53 (4): 256 – 62.