TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INGESTA DE κ-CARRAGENANO SOBRE EL ESTADO INFLAMATORIO Y OXIDATIVO DEL TIMO DE RATONES JÓVENES

Autor/es: **Paula Pariente Herrera**

Villaviciosa de Odón, 10 de enero de 2026

ANEXO IX

Título del Trabajo: Análisis del efecto de la ingesta de κ-carragenano sobre el estado inflamatorio y oxidativo del timo de ratones jóvenes.

Este trabajo ha sido realizado en la Universidad Europea de Madrid (UEM) en el grupo *Nanocaging Research Group* perteneciente al Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud.

Tutor/es: PhD. Manuel Olazábal Morán

Índice

1. Resumen *1*

2. Introducción *1*

3. Objetivos *7*

4. Metodología *7*

4.1. Animales y diseño experimental **7**

4.2. Obtención de lisados tisulares **8**

4.3. Cultivos celulares **9**

4.4. Cuantificación de proteínas **9**

4.5. Preparación de muestras proteicas **9**

4.6. Electroforesis y transferencia **9**

4.7. Inmunodetección **10**

4.8. Revelado y análisis de resultados **10**

4.9. Análisis estadístico **10**

5. Resultados y discusión *11*

5.1. Evaluación inicial de la expresión de proteínas asociadas a las vías de oxidación e inflamación en ratones tratados con κ-CGN **11**

5.2. Optimización del ensayo de western blot **13**

5.2.1. Optimización de los tampones y la electroforesis 13

5.2.2. Optimización de la transferencia a membrana y de los anticuerpos 17

5.3. Evaluación de la expresión de proteínas asociadas a la vía de oxidación en ratones tratados con κ-CGN tras la optimización del protocolo western blot **20**

5.4. Limitaciones del estudio **26**

5.5. Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) **27**

6. Conclusiones *27*

7. Bibliografía *28*

ANEXO I. ABREVIATURAS *34*

1. Resumen

El κ-carragenano (κ-CGN) es un aditivo alimentario ampliamente empleado en alimentos ultraprocesados, cuyo consumo elevado ha suscitado preocupación debido a sus posibles efectos adversos asociados a procesos de oxidación molecular y a la activación de respuestas inflamatorias. En este estudio se analizó la respuesta molecular del timo en ratones Swiss machos y hembras de dos meses de edad expuestos a κ-CGN (540 mg/kg/día) durante dos semanas. La optimización de la técnica de western blot permitió evaluar la expresión de proteínas efectoras de la vía regulada por Nrf2, implicada en la respuesta antioxidante. Aunque los resultados no alcanzaron significación estadística, en los ratones macho expuestos se observó una mayor expresión de Nqo1 y Akr1c3, lo que sugiere una activación de mecanismos de respuesta frente a la producción de especies oxidantes inducidas por el aditivo. En contraste, las hembras tratadas mostraron una menor expresión de los niveles de Akr1c3 y G6pd, lo que podría indicar una ausencia de activación de esta vía en respuesta a la administración de κ-CGN. En conjunto, estos resultados apuntan a la existencia de un dimorfismo sexual en la respuesta antioxidante del timo frente al κ-CGN, destacando la influencia del sexo en la modulación de procesos biológicos. Si bien la respuesta inflamatoria no fue evaluada experimentalmente en este trabajo, la estrecha interrelación entre la oxidación molecular y la inflamación respalda el potencial proinflamatorio del κ-CGN y subraya la necesidad de continuar investigando sus efectos inmunobiológicos.

PALABRAS CLAVE: κ-carragenano; estrés oxidativo; inflamación; Nrf2; Nf-κb

2. Introducción

Los alimentos ultraprocesados (UPF, del inglés "*ultra-processed foods*") se han incorporado en la dieta habitual de una amplia proporción de la población mundial y su alto consumo se ha asociado a la aparición o agravamiento de patologías no transmisibles, como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Pagliai *et al*., 2020). Estos efectos adversos se atribuyen, en gran medida, a su elevado contenido en aditivos alimentarios, definidos como sustancias que se añaden a los alimentos para mejorar sus características y su vida útil (Wu *et al*., 2022). Entre ellos, el carragenano (CGN) destaca como uno de los compuestos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, especialmente en productos lácteos y cárnicos (Sellem *et al*., 2024).

El CGN es un polisacárido sulfatado derivado de algas rojas del filo *Rhodophyta*, constituido por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa unidas por enlaces α-1,3 y β-1,4 (Jabeen *et al*., 2025). A nivel molecular, presenta dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que le confiere una elevada capacidad para la estabilización de lípidos. Estas propiedades fisicoquímicas permiten que el CGN actúe como estabilizante, gelificante, espesante y emulsionante, con aplicaciones no solo en la industria alimentaria, sino también en los sectores farmacéutico y cosmético (Pagliai *et al*., 2020).

Actualmente, más del 90% de la producción mundial de CGN deriva de los géneros *Eucheuma* y *Kappaphycus.* En el ámbito alimentario, este se clasifica en tres tipos principales —kappa- (κ-), iota- (ι-) y lambda- (λ-)CGN— que difieren por la presencia de uno, dos o tres grupos sulfato en las unidades de repetición de disacáridos, respectivamente. Estos grupos órgano-sulfato confieren carga negativa al polímero y facilitan sus interacciones con agua y cationes como el potasio, modulando sus propiedades reológicas y capacidad de gelificación (Rupert *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, el CGN se ha considerado un compuesto seguro para su uso en la industria alimentaria. En Estados Unidos cuenta con la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) y está incluida en la categoría *Generally Recognized As Safe* (GRAS), mientras que en Europa ha sido autorizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) bajo la denominación E-407 (FDA, 2025; Younes et al., 2018). Ambas instituciones han evaluado exhaustivamente su inocuidad, confirmando la ausencia de efectos tóxicos en las condiciones establecidas y definiendo límites de ingesta diaria aceptable (David *et al*., 2018). Sin embargo, esta percepción errónea sobre la inocuidad del CGN se ha asociado principalmente a los resultados obtenidos en estudios *in vitro*, en los que la sustancia ha mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria y antitrombótica (McKim, 2014). No obstante, investigaciones *in vivo* han demostrado que ciertos productos hidrolizados derivados del CGN (d-CGN), que son generados durante el paso a través del tracto gastrointestinal, pueden desencadenar respuestas inflamatorias y aumentar la permeabilidad de la barrera intestinal, promoviendo daños a nivel sistémico (Fahoum *et al*., 2017).

En este contexto, se han identificado recientemente algunas de las cepas bacterianas responsables de la hidrólisis del κ-CGN en el intestino de mamíferos. Concretamente, en la investigación de Zhong *et al*. (2025) se aislaron tres especies del género *Bacteroides* (*B. xylanisolvens*, *B. zhangwenhongii* y *B. difficilis*), que expresan carragenasas, unas hidrolasas capaces de degradar el polímero y generar cantidades significativas de d-CGN (Zhong *et al*.,

2025). Estas evidencias ponen de manifiesto que la microbiota intestinal desempeña un papel determinante en la transformación y toxicidad potencial del CGN, lo que ha llevado a organismos reguladores como la EFSA a considerar la incorporación del análisis del microbioma en las evaluaciones de riesgo, reconociendo que la seguridad del aditivo no puede entenderse sin atender a estas interacciones (David *et al*., 2018).

La relevancia fisiopatológica de la toxicidad asociada al d-CGN ha sido también evaluada en ensayos clínicos, entre los cuales destaca un estudio aleatorizado en pacientes con colitis ulcerosa (CU) en remisión. En dicho estudio, los individuos expuestos a una dosis baja de CGN mostraron una mayor frecuencia de recaídas, así como un incremento significativo de los marcadores inflamatorios interleucina-6 (IL-6) y calprotectina fecal, en comparación con aquellos que recibieron placebo. Estos resultados no solo evidencian los efectos adversos del CGN en pacientes con CU, sino que también respaldan la hipótesis de que este polisacárido puede inducir respuestas proinflamatorias sostenidas (Bhattacharyya *et al.*, 2017).

De esta manera, se evidencia que las dietas ricas en UPFs pueden inducir inflamación sistémica de bajo grado, en parte debido a la presencia de aditivos alimentarios como el CGN. Este compuesto, que con frecuencia no se absorbe, puede modificar la composición de la microbiota intestinal, favoreciendo el aumento de cepas bacterianas productoras de endotoxinas, alterar la permeabilidad de la barrera intestinal y, como consecuencia, modular de manera directa la respuesta inflamatoria a través de receptores tipo Toll (TLR, del inglés "*Toll-like receptors*") (Borsani *et al*., 2021).

Con relación a la regulación de la respuesta inflamatoria, la vía de señalización orquestada por el factor nuclear kappa B (NF-κB) adquiere especial relevancia, pues constituye un centro integrador de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Este factor de transcripción desempeña además un papel esencial en diversos procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia (Oeckinghaus *et al*., 2009). En estado basal, NF-κB permanece inactivo en el citoplasma, formando complejos con proteínas inhibidoras de κB (IκB). Ante la estimulación por señales proinflamatorias o de estrés celular, se activa la vía de la quinasa de IκB (IKK), que fosforila a IκB y desencadena su ubiquitinación y posterior degradación proteasomal. Como consecuencia, los dímeros de NF-κB se liberan y translocan al núcleo, donde se unen a los elementos potenciadores κB, secuencias de ADN específicas

presentes en promotores de genes proinflamatorios que codifican efectores de la respuesta inmunitaria, como las interleucina-1β (IL-1β) e IL-6 (Tak & Firestein, 2001) (**Figura 1A**).

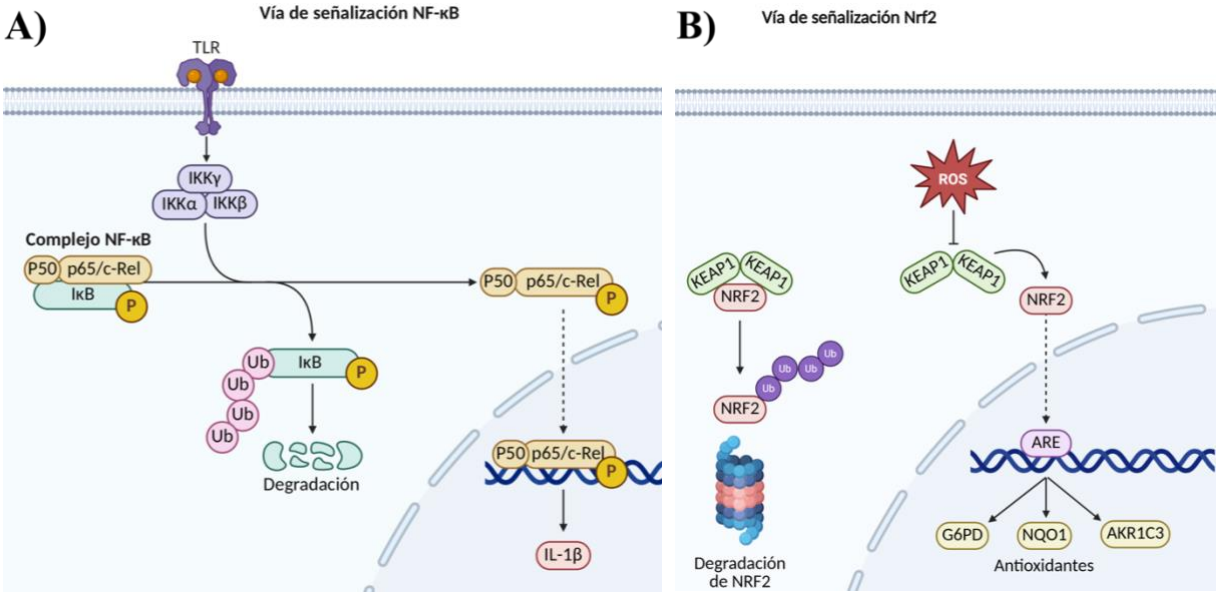


Figura 1. Activación de las vías de señalización NF-κB y NRF2 en respuesta a estímulos proinflamatorios y oxidantes. (A) La vía NF-κB se inicia tras la detección de señales de daño por los TLR, lo que conduce a la activación del complejo IKK (IKKα, IKKβ e IKKγ). Este complejo fosforila a IκB, favoreciendo su degradación y permitiendo la liberación del heterodímero NF-κB (p65/p50). Posteriormente, NF-κB se transloca al núcleo, donde induce la expresión de proteínas proinflamatorias, como la IL-1β. **(B)** En presencia de ROS, NRF2 se separa de su represor KEAP1, lo que posibilita su estabilización citosólica y su desplazamiento al núcleo. En el núcleo, NRF2 se une a los ARE, promoviendo la expresión de enzimas citoprotectoras como G6PD, AKR1C3 y NQO1, involucradas en la detoxificación y neutralización de moléculas oxidantes. Imagen generada con Biorender.com.

Actualmente, se ha establecido que la inflamación y la oxidación son procesos biológicos interconectados de manera sinérgica (Bellanti *et al*., 2025). Por lo tanto, es vital conocer cómo el CGN modula la respuesta antioxidante y, por ende, la homeostasis redox. En este sentido, se ha observado que tanto la concentración como la distribución espacial de los grupos sulfato presentes en el CGN modulan su capacidad oxidante y han sido descritos como inductores de diversas especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "*reactive oxygen species*") (Yermak *et al*., 2012). Las ROS son moléculas oxigenadas con alta reactividad química, cuyos niveles intracelulares se mantienen estrictamente controlados por diversos sistemas antioxidantes. No obstante, una producción excesiva de ROS puede exceder la capacidad antioxidante de la célula, dando lugar a una alteración del equilibrio redox. Cuando esté equilibrio persiste en el tiempo, se instaura un estado de estrés oxidativo (OS, del inglés "*oxidative stress*"), el cual induce daño en macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y contribuye al desarrollo y progresión de diversas patologías (Herb, Gluschko & Schramm, 2021).

Dada la vulnerabilidad celular al establecimiento de OS, es necesario que existan mecanismos de mantenimiento de la homeostasis redox. El principal regulador citoprotector de la célula es *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), un elemento fundamental en la defensa celular frente al OS, ya sea de origen intrínseco o extrínseco. En condiciones fisiológicas, NRF2 permanece unido a su inhibidor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) en el citosol, el cual facilita su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma (Adinolfi *et al*., 2023).

Sin embargo, la presencia de ROS promueve la oxidación de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de KEAP1, que alteran su función reguladora al romper su interacción con NRF2 (Dinkova-Kostova, Kostov & Canning, 2017). Como consecuencia, NRF2 es liberado y se transloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción al formar heterodímeros con miembros de la familia de proteínas *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) y unirse a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes en los promotores de sus genes diana. De esta manera, NRF2 gobierna la respuesta antioxidante, ya que esta activación transcripcional induce la expresión de diversas enzimas detoxificantes y antioxidantes, las cuales contribuyen a contrarrestar el daño generado por las ROS (Adinolfi *et al*., 2023). Entre los productos génicos regulados por esta vía se incluyen componentes esenciales de los sistemas antioxidantes basados en glutatión (GSH) y tioredoxina (TXN), así como enzimas implicadas en la regeneración de NADPH, la biotransformación de xenobióticos y el metabolismo del grupo hemo (Tonelli *et al*., 2018).

En este sentido, algunos de los efectores más destacados son NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), una enzima clave en la reducción directa de quinonas mediante un mecanismo biorreductivo de dos electrones. Esta reacción evita la formación de semiquinonas y la generación secundaria de ROS, limitando así el potencial oxidante de estos compuestos (Dinkova-Kostova & Talalay, 2010). Otro elemento fundamental es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), responsable del paso inicial de la vía de las pentosas fosfato y principal fuente de NADPH en la célula; este cofactor resulta indispensable para la regeneración del GSH reducido y, en consecuencia, para la neutralización de ROS, como peróxidos y radicales libres (Tonelli *et al*., 2018). Asimismo, la enzima aldo-ceto reductasa familia 1 miembro C3 (AKR1C3) desempeña un papel determinante en la eliminación de aldehídos tóxicos derivados de la peroxidación lipídica. En particular, AKR1C3 cataliza la reducción del 4-hidroxinonenal (4-HNE) y otros aldehídos reactivos a formas menos electrofílicas, contribuyendo a preservar la integridad de membranas, proteínas celulares y ácidos nucleicos (Penning, 2017) (**Figura 1B**).

Las vías NF-κB y NRF2 están interconectadas, reflejando una estrecha conexión entre inflamación y oxidación (Bellanti *et al*., 2025). En este contexto, cabría esperar que la exposición prolongada a κ-CGN pudiera perturbar este equilibrio dinámico del estado de inflamación y oxidación. Así, Lopes *et al*. (2020) demostraron que la exposición a d-CGN activa macrófagos a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4, del inglés *Toll-like Receptor 4*), lo que induce una producción sostenida de ROS. Estas moléculas actúan como segundos mensajeros en la activación del inflamasoma receptor tipo NOD con dominio pirina 3 (NLRP3), un complejo multiproteico responsable de la maduración y liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-1β (Lopes *et al*., 2020). Este mecanismo es un evento clave en la inflamación aguda y crónica, contribuyendo a la activación de otras células inmunitarias y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria. Estos hallazgos ponen de manifiesto el papel central de la oxidación en la amplificación de la respuesta inflamatoria inducida por el CGN, estableciendo un bucle de retroalimentación patogénico en el que la inflamación y la oxidación se potencian mutuamente.

De manera complementaria, el estudio reciente de Félix *et al*. (2024) ha evidenciado los efectos perjudiciales del κ-CGN a nivel sistémico. Para ello, se emplearon ratones jóvenes de ambos sexos, de dos meses de edad, a los que se administró una dosis de κ-CGN diaria de 540mg/kg durante 15 días. Los resultados obtenidos mostraron alteraciones en el comportamiento, con niveles de ansiedad elevados, junto con un deterioro globlal de la función inmunológica, asociado a un perfil proinflamatorio y a un incremento del OS. Estos efectos persistieron y se agravaron en la edad adulta y en la vejez, lo que ha conllevado a un proceso de envejecimiento acelerado y a una reducción significativa de longevidad en los animales expuestos frente a los controles. Asimismo, el estudio reveló un dimorfismo sexual en la respuesta al κ-CGN, con una mayor afectación inmunológica y conductual en hembras. Los autores sugieren que estas diferencias podrían estar moduladas por factores hormonales e inmunometabólicos, lo que pone de manifiesto que unos sistemas antioxidantes y antiinflamatorios basales más robustos en las hembras podrían conferir una mayor vulnerabilidad frente a la exposición crónica durante la vejez (Félix *et al*., 2024).

En línea con estos hallazgos, Ariño-Sinusía (2025) evaluó el potencial papel inflamatorio y oxidante del κ-CGN en corazón e hígado empleando el mismo modelo experimental. El análisis de proteínas mediadoras de la vía antioxidante regulada por Nrf2 y de la vía inflamatoria mediada por Nf-κb mostró una mayor expresión de sus efectores en las muestras tratadas respecto a los controles, con patrones de expresión diferenciales según el sexo. Por

consiguiente, los resultados refuerzan la existencia de un dimorfismo sexual de manera sistémica en la activación de las respuestas antioxidante e inflamatoria tras la exposición al κ-CGN (Ariño-Sinusía, 2025).

A la luz de estos antecedentes, resulta de interés profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuales la ingesta de κ-CGN altera el equilibrio inflamatorio y redox en órganos inmunitarios primarios. El timo constituye un modelo especialmente relevante, ya que mantiene una red inflamatoria constitutiva estrictamente regulada, esencial para la selección, maduración y tolerancia de los linfocitos T, y es particularmente vulnerable a la disrupción de la homeostasis redox (Thapa & Farber, 2019). Consecuentemente, la generación sostenida de ROS y la potenciación de la inflamación pueden comprometer su arquitectura y funcionalidad, favoreciendo procesos de involución tímica, senescencia celular y alteraciones en la respuesta inmunitaria (Hester *et al*., 2022). Por todo ello, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la expresión de mediadores clave de las vías de inflamación (Nf-κb) y oxidación (Nrf2) en el timo de ratones tras la exposición a κ-CGN, con el fin de contribuir a la comprensión de los efectos perjudiciales de este aditivo a nivel sistémico.

3. Objetivos

El objetivo general del estudio fue determinar el grado de activación de los factores de transcripción centrales en la regulación de las vías inflamatorias (Nf-κb) y de respuesta oxidativa (Nrf2) en el timo de ratones jóvenes tratados con κ-CGN.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la actividad de las principales moléculas reguladoras implicadas en la señalización inflamatoria (Nf-κb) y oxidativa (Nrf2/Keap1), junto con el análisis de expresión de proteínas efectoras representativas de ambas vías (Nqo1/G6pd/Akr1c3 e Il-1β).
- Evaluar la influencia del sexo en la modulación de las respuestas inflamatorias y oxidativas inducidas por la exposición a κ-CGN.

4. Metodología

4.1. Animales y diseño experimental

En este estudio se emplearon ratones jóvenes de ambos sexos a dos meses de edad, pertenecientes a la cepa Swiss. Esta línea, caracterizada por su variabilidad genética, resulta

especialmente útil para explorar respuestas biológicas en contextos fisiológicos complejos, lo que permite obtener información más representativa sobre procesos de regulación y alteración celular (Klöting *et al*., 2003).

Los animales se mantuvieron en un ambiente estrictamente controlado —22 ± 2 °C, humedad relativa del 50–60 % y un ciclo luz-oscuridad invertido de 12 h/12 h, con el periodo de oscuridad iniciando a las 08:00 AM— con el objetivo de reducir al mínimo las variaciones dependientes del ritmo circadiano. Tanto el agua como la dieta estándar A04 (Panlab S.L., Barcelona, España) se proporcionaron de manera *ad libitum*, en conformidad con las recomendaciones del *American Institute of Nutrition* para modelos murinos. El proyecto experimental fue revisado y autorizado por el Comité de Investigación de la Universidad Europea de Madrid (UEM-CI), por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid y por la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura e Interior de la Comunidad de Madrid (PROEX 224.0/21). Todas las intervenciones se desarrollaron de acuerdo con la normativa europea vigente sobre bienestar animal (Directiva ECC/566/2015).

Los ratones fueron asignados de forma aleatoria a dos condiciones experimentales, con diez individuos por grupo. El grupo control únicamente recibió agua, mientras que el grupo tratado recibió κ-CGN a una dosis de 540 mg/kg/día, administrada durante 15 días en un volumen de 200 µL de agua mineral mediante micropipeta. Esta concentración se seleccionó basándose en cálculos de exposición humana máxima descritos previamente (Younes *et al*., 2018).

Al término del periodo de administración, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción del timo para los análisis posteriores de las vías de señalización asociadas a inflamación (Nf-κb) y respuesta antioxidante (Nrf2).

4.2. Obtención de lisados tisulares

Los órganos extraídos se conservaron a -80ºC hasta su procesamiento. El extracto celular correspondiente a cada condición experimental se obtuvo mediante la disgregación y homogeneización manual del órgano en tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma- Aldrich). Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, con agitación manual cada 5 minutos. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se recuperaron y almacenaron a −80 °C hasta su análisis posterior. Los lisados proteicos derivados de líneas celulares se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo.

4.3. Cultivos celulares

Se utilizaron lisados proteicos de la línea humana epitelial embrionaria de riñón 293T (HEK 293T, del inglés, "*human embryonic kidney 293T cells*") (CRL-3216) como controles en los ensayos de inmunodetección. Para ello, las células se mantuvieron siguiendo los protocolos estándar de cultivo celular (95% de humedad, 5% CO2 y 37ºC) en DMEM suplementado con 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS), 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 1mM piruvato sódico, 100 IU/mL penicilina y 100µg/mL estreptomicina.

4.4. Cuantificación de proteínas

La concentración proteica se cuantificó utilizando el ensayo del ácido bicinconínico (BCA assay, Thermo Fisher Scientific), empleando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como proteína de referencia. A partir de las absorbancias obtenidas a 562 nm, medidas en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), se construyó la curva de calibración que permitió determinar la concentración total de proteína en cada muestra.

4.5. Preparación de muestras proteicas

Se prepararon las muestras para cargar 50-100µg de proteína total diluidas en tampón de Laemmli (24 mM Tris-HCl pH 6.3, 2 % glicerol, 1.2 % SDS, 5 % β-mercaptoetanol, 0.01 % azul de bromofenol). Previamente, se procedió a la desnaturalización proteica mediante la incubación de las muestras a 95ºC durante 5 minutos.

4.6. Electroforesis y transferencia

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida y se separaron mediante una electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE) utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) con tampón de electroforesis (25mM Tris-HCl pH 8.3, 190mM glicina, 0.1% SDS). Se emplearon geles al 8% y 12% de poliacrilamida para garantizar una adecuada resolución de la electroforesis y visualización de las proteínas con distintos pesos moleculares. La electroforesis se desarrolló a 90 V en la fase de apilamiento y 120 V en la fase de separación. Finalmente, las muestras se transfirieron mediante los protocolos de transferencia húmeda y semihúmeda (Trans-Blot Turbo) a diferentes condiciones de tiempo, voltaje y amperaje, utilizando tampón de transferencia (25mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM glicina, 20% metanol, 0.1% SDS). Estas condiciones se describen en el apartado correspondiente de resultados (5.2. Optimización del ensayo western blot). Se realizó una tinción del gel con azul de Coomassie (Bio-Rad *Coomassie Brilliant Blue* G-250 #1610406) y una tinción de la membrana con rojo Ponceau (Thermo Fisher Scientific Ponceau S A40000279, 5% ácido acético) para garantizar el buen funcionamiento de las técnicas y visualizar las bandas proteicas.

4.7. Inmunodetección

Las membranas fueron tratadas con una solución de bloqueo (TBS-T [20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1 % Tween-20] suplementado con 5% de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró la solución y se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C: NRF2 (1:1000, Cell Signaling Technology #12721), KEAP1 (1:1000, Cell Signaling Technology #4678), G6PD (1:1000, Cell Signaling Technology #8866), AKR1C3 (1:1000, Cell Signaling Technology #13035), NQO1 (1:1000, Cell Signaling Technology #62262), p-NF-κB p65 (1:1000, Thermo Fisher Scientific #PA5-27617), NF-κB-T p65 (1:1000, Thermo Fisher Scientific #436700), p-AKT (1:1000, Cell Signaling Technology #9271), AKT-T (1:1000, Cell Signaling Technology #9272), p-GSK3β (1:1000, Thermo Fisher Scientific #702230), GSK3β-T (1:1000, Thermo Fisher Scientific #44-610), IL-1β (1:1000, Thermo Fisher Scientific #M421B), α-tubulina (1:5000, Cell Signaling Technology #2144) y β-actina (1:5000, Cell Signaling Technology #4967).

Se realizaron tres lavados en TBS-T, de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés, "*horseradish peroxidase*") según la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario (anti-rabbit IgG, 1:5000, Millipore A0545; anti-mouse IgG, 1:5000). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las membranas de nuevo tres veces con TBS-T.

4.8. Revelado y análisis de resultados

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Thermo Scientific) utilizando un equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad). La densitometría de las bandas obtenidas se realizó con el software ImageJ (NIH, EE. UU.), normalizando la intensidad de cada proteína de interés con respecto al control de carga β-actina.

4.9. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el software de GraphPad Prism. Inicialmente, se seleccionó un control como valor de referencia (100%), al que se normalizaron el resto de los valores obtenidos. La estadística descriptiva permitió calcular el promedio y el error estándar para los grupos control (N=4 en ambos sexos) y tratamiento (N=4 en machos; N=1 en hembras). La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk, obteniéndose valores de $p > 0,05$ en todas las variables analizadas, lo que confirmó el cumplimiento del supuesto de normalidad. En consecuencia, se aplicó la prueba paramétrica t de Student para la comparación entre el grupo control y el grupo expuesto a κ-CGN en machos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas (ns; $p > 0,05$). En el caso de las

hembras, no fue posible realizar el análisis comparativo debido a la disponibilidad de un único valor de expresión relativa correspondiente a una réplica del grupo tratado (T2).

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación inicial de la expresión de proteínas asociadas a las vías de oxidación e inflamación en ratones tratados con κ-CGN

El análisis de la expresión de proteínas implicadas en las vías de Nrf2 y Nf-κb se llevó a cabo mediante western blot a partir de timos de ratones tratados y no tratados con κ-CGN (**Figura 2**).

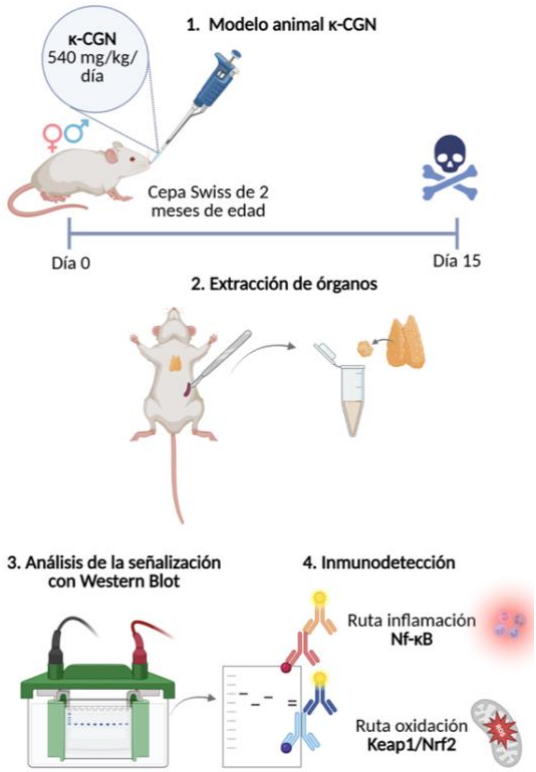


Figura 2. Metodología experimental. Esquema del procedimiento seguido para evaluar el impacto del κ-CGN en ratones Swiss. **(1)** Administración oral de κ-CGN (540 mg/kg/día) durante dos semanas en ratones macho y hembra de 2 meses de edad. **(2)** Obtención del timo al finalizar el periodo de tratamiento. **(3)** Evaluación de las vías de señalización inflamatoria (Nf-κb) y oxidativa (Keap1/Nrf2) mediante análisis por western blot. **(4)** Inmunodetección de proteínas clave implicadas en los procesos inflamatorios y oxidativos. Imagen generada con Biorender.com.

El western blot es una técnica muy común y ampliamente utilizada para la detección de proteínas específicas a partir de muestras complejas (Sule, Rivera & Gomes, 2023). Los primeros análisis brindaron unos resultados subóptimos, lo que imposibilitó la cuantificación e interpretación de los mismos. En términos generales, tanto en las muestras procedentes de ratones macho como de hembras se observaron niveles muy bajos o indetectables de expresión en todas las proteínas reguladoras de la vía Nrf2 analizadas (**Figura 3**).

Con relación al control de carga β-actina, en los machos se detectó una expresión heterogénea entre las muestras y, con intensidades muy bajas, lo que obligó a emplear tiempos de exposición prolongados (120 segundos) en el sistema de detección (**Figura 3A**). De manera paralela, los niveles de β-actina en hembras fueron prácticamente indetectables incluso tras aplicar el tiempo máximos de exposición (120 segundos) (**Figura 3B**). Del resto de proteínas analizadas, cabe destacar que en ambos sexos se detectó una señal débil correspondiente a Keap1.

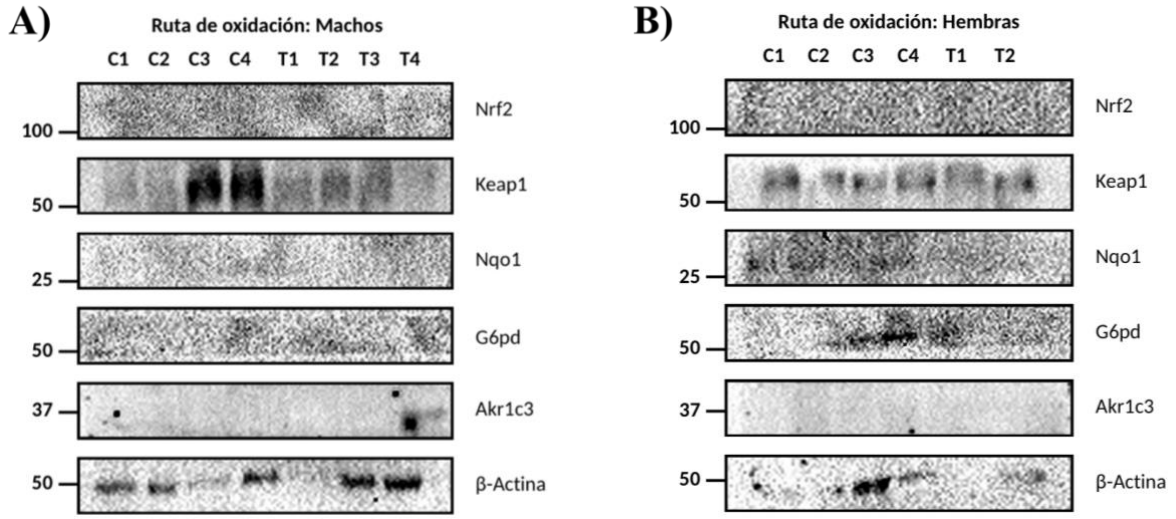


Figura 3. Detección preliminar de mediadores de la ruta de oxidación en timos de ratones bajo condiciones no optimizadas. Expresión proteica de Nrf2, Keap1, Nqo1, Akr1c3 y G6pd en ratones jóvenes macho **(A)** y hembras **(B)** mediante western blot. Se empleó β-actina como control de carga.

De forma similar, el análisis de las proteínas efectoras de la vía de inflamación reveló niveles de expresión muy bajos en ambos sexos. En machos, únicamente se detectaron bandas correspondientes a la proteína precursora de Il-1β en las muestras tratadas T2 y T3 (**Figura 4A**). En hembras, se observó igualmente una señal débil de Il-1β en las muestras tratadas, así como una leve expresión de Nf-κb en las muestras C3 y C4 (**Figura 4B**). No obstante, la ausencia de señal en el control de carga impidió la normalización de las bandas, por lo que los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones fiables.

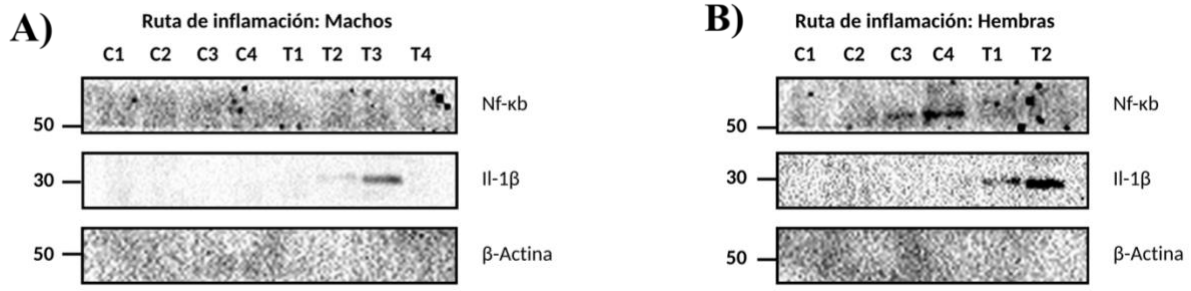


Figura 4. Detección preliminar de mediadores de la ruta de inflamación en timos de ratones bajo condiciones no optimizadas. Expresión proteica de Nf-κb e Il-1β en ratones jóvenes macho **(A)** y hembras **(B)** mediante western blot. Se empleó β-actina como control de carga.

Debido a la complejidad y a la larga extensión del protocolo de western blot es común la aparición de errores en alguno de sus múltiples pasos, lo que en muchas ocasiones afecta negativamente a la obtención y fiabilidad de los resultados (Sule, Rivera & Gomes, 2023). Bajo estas consideraciones, los resultados preliminares observados podrían atribuirse a imprecisiones surgidas durante la ejecución del procedimiento, por lo que se procedió a realizar una optimización integral del mismo.

5.2. Optimización del ensayo de western blot

A la vista de la baja calidad de los resultados obtenidos, fue necesario llevar a cabo un análisis de los distintos pasos críticos del protocolo de western blot para realizar una optimización exhaustiva de la técnica (**Figura 5**). Para ello, se examinó detalladamente la composición de cada uno de los tampones y reactivos empleados, se ajustaron distintos parámetros y condiciones de transferencia a membrana, y se evaluó el rendimiento de los anticuerpos primarios y secundarios mediante el uso de diferentes diluciones.

5.2.1. Optimización de los tampones y la electroforesis

La identificación de los posibles factores de error en el protocolo de western blot se abordó desde la etapa de preparación de la muestra, por lo que los tampones de lisis (RIPA) y de carga (Laemmli) se prepararon nuevamente. Concretamente, los lisados proteicos se obtuvieron con la aplicación del *buffer* de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se mantuvieron a 4 °C para asegurar la estabilidad y eficacia de dichos inhibidores (Castellanos-Serra & Paz-Lago, 2002). Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína de las diferentes muestras y se prepararon extractos de 50 µg de proteína total. Estos se diluyeron en tampón Laemmli para hacer una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y otorgar a la muestra unas características convenientes para la correcta resolución electroforética (Backman & Persson, 2018). Puesto que no se detectó ninguna desviación en la etapa de la preparación de la muestra, se procedió a revisar y modificar los tampones utilizados para la preparación de los geles de poliacrilamida, la electroforesis y la transferencia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diferencias en la elaboración de los tampones de western blot previas y posteriores al proceso de optimización. Se comparan la identificación y corrección de errores de los tampones del gel concentrador, de electroforesis y de transferencia.

Tampones	Antes de la optimización	Después de la optimización
Gel concentrador	1.25 M Tris-HCl	0.125 M Tris-HCl
Electroforesis	Reutilizado en múltiples electroforesis	Nuevo para cada electroforesis
Transferencia	292 mM glicina	192 mM glicina

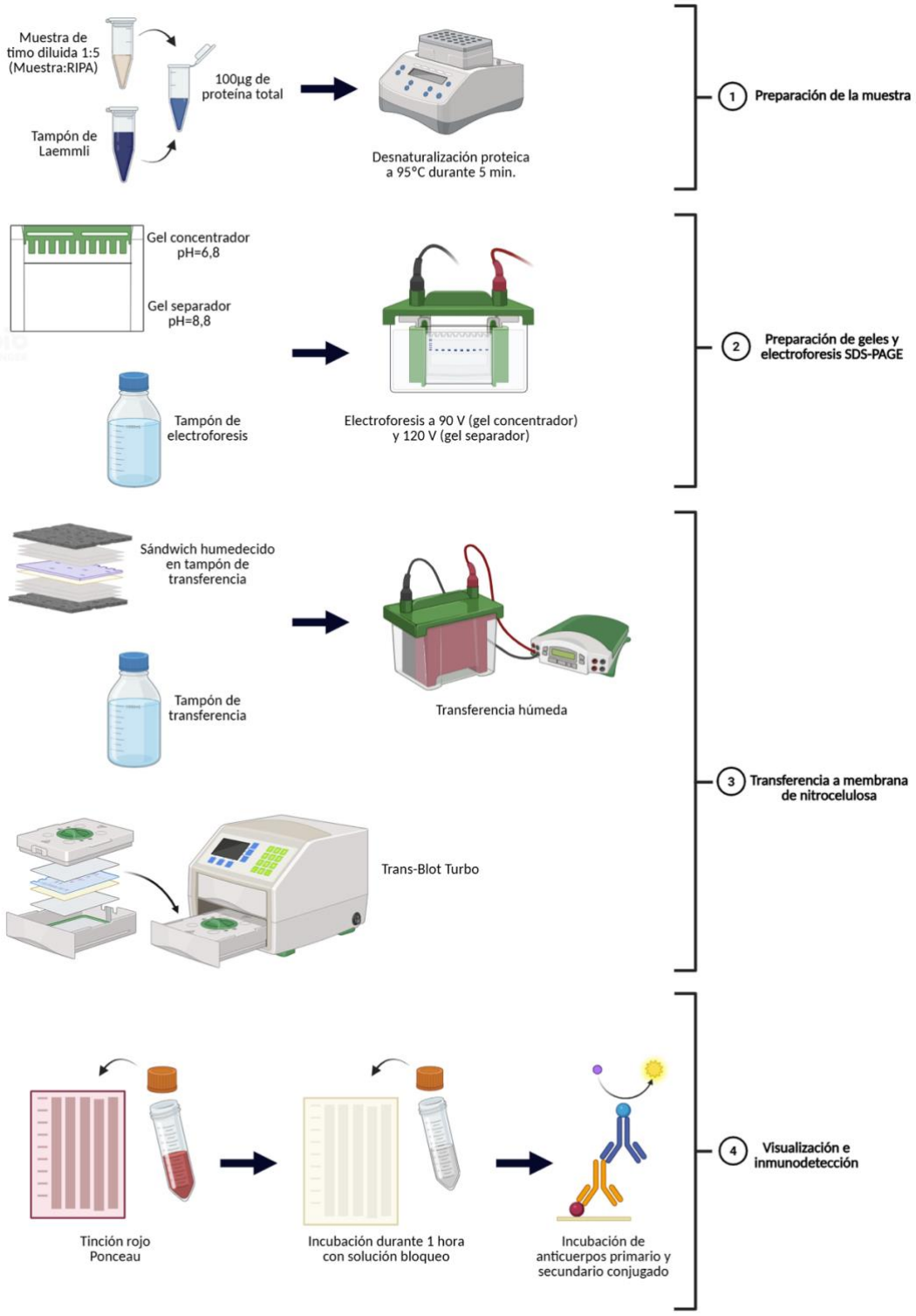


Figura 5. Protocolo de western blot. En el esquema se representan el protocolo realizado y los pasos críticos del mismo. **(1)** Preparación de las muestras proteicas diluidas en tampón de Laemmli y posterior desnaturalización a 95ºC durante 5 minutos. **(2)** Preparación de los geles al 8% y 12% de acrilamida, carga de la muestra y electroforesis a 90 V en la fase de apilamiento y 120 V en la fase de separación. **(3)** Transferencia a la membrana de nitrocelulosa utilizando los sistemas de transferencia húmeda y semihúmeda. **(4)** Tinción de la membrana con rojo Ponceau e inmunodetección, que incluye una incubación con solución de bloqueo durante una hora, seguida de la incubación con el anticuerpo primario durante la noche y, finalmente, la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante una hora. Imagen generada con Biorender.com

Puesto que el funcionamiento de la SDS-PAGE se encuentra totalmente condicionado por la composición de los geles de acrilamida, se procedió a analizar su preparación. Inicialmente, la concentración empleada de Tris-HCl en el gel concentrador fue de 1.25 M, lo que dio lugar a un frente de avance difuso y a una aparición de bandas con morfología irregular (datos no mostrados). Tras una revisión literaria, la molaridad del tampón se ajustó a 0.125 M, lo que permitió corregir dicha alteración (Rabilloud, 2010). El uso de una solución tamponadora diez veces más concentrada de lo recomendado incrementa la fuerza iónica y la capacidad amortiguadora del sistema, perturbando el gradiente de pH y el proceso de apilamiento proteico característico del gel concentrador (Zhao *et al*., 2010).

Asimismo, se examinó la formulación y el uso del tampón de electroforesis. Aunque el protocolo aplicado era adecuado, la reutilización del tampón en múltiples electroforesis favoreció la acumulación de productos de electrólisis, derivados de reacciones redox, que alteran las concentraciones iónicas y el pH del sistema, además de inducir modificaciones químicas en las proteínas (Lee & Chang, 2009). Estas alteraciones pudieron ser las responsables de comprometer la migración electroforética, por lo que se dejó de reutilizar el *buffer* de electroforesis entre ensayos.

De la misma forma, se revisó el protocolo de preparación del tampón de transferencia o tampón Towbin, identificándose una concentración incorrecta de glicina (292 mM). La literatura especializada establece que la concentración óptima de glicina en este tampón es de 192 mM y señala que su exceso compromete la eficiencia de la transferencia proteica. El aumento de la fuerza iónica incrementa la conductividad eléctrica, favoreciendo la generación de calor y alterando el gradiente de pH entre el gel y la membrana. Como consecuencia, se acelera la migración electroforética, se ve afectada la interacción proteína–membrana y se dificulta la transferencia de proteínas de alto peso molecular (Blancher & Cormick, 2012). Tras detectarlo, el *buffer* de transferencia pasó a utilizarse a una concentración de glicina de 192 mM.

Finalmente, la eficacia de la separación por SDS-PAGE y de la transferencia húmeda se evaluó mediante la tinción del gel con azul de Coomassie y de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Para ello, se cargaron muestras de BSA (1 µg, 10 µg y 20 µg), células HEK 293T (50 µg de lisado total) y una muestra tímica (100 µg de lisado total). En un mismo gel, se cargaron las muestras por duplicado y, tras la electroforesis, se seccionó en dos mitades equivalentes. Una se tiñó directamente con azul de Coomassie y la otra se sometió al proceso de transferencia, para comparar el contenido proteico entre ambos geles (transferido y no transferido) y entre el gel transferido y la membrana resultante.

Los resultados evidenciaron que, tras la implementación de las modificaciones derivadas de la optimización del proceso electroforético, se obtuvieron bandas bien definidas y homogéneas correspondientes a cada tipo de muestra en el gel no sometido a transferencia (**Figura 6A**). Por otro lado, la tinción del gel con azul de Coomassie mostró altos niveles de proteína en la muestra de células HEK 293T similares a los observados en el gel previo a la transferencia, lo que indica una eficiencia deficiente del procedimiento (**Figura 6B**). En contraste, los pocillos correspondientes a las distintas cantidades de BSA no presentaron bandas detectables.

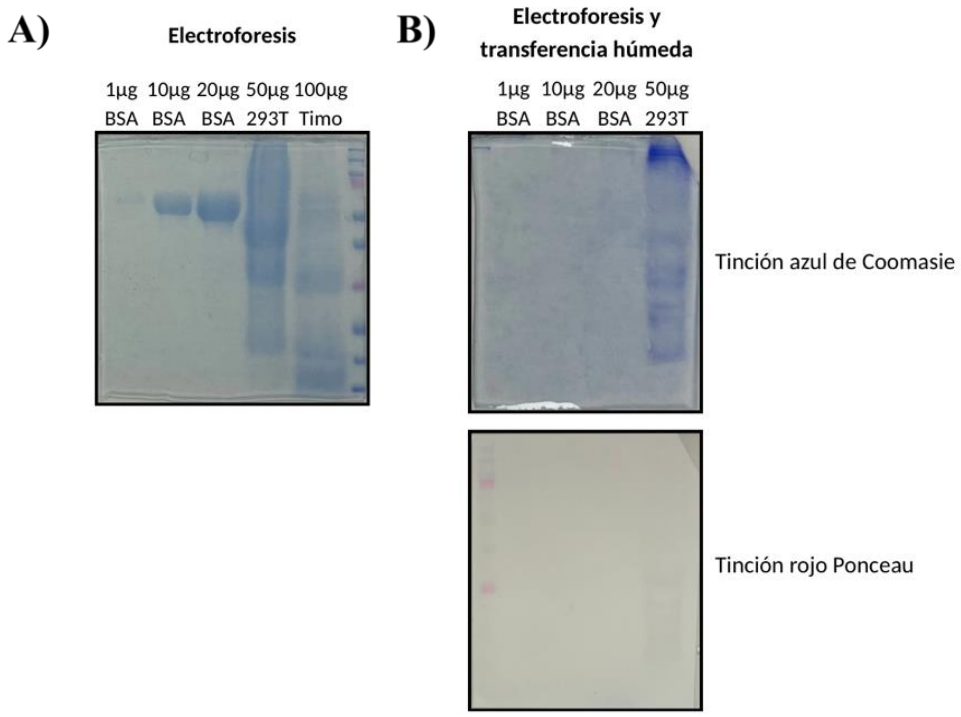


Figura 6. Evaluación de la efectividad de la transferencia húmeda. Comparación de la cantidad de proteína detectada mediante tinción con azul de Coomassie en el gel y tinción con rojo Ponceau tras la transferencia a membrana de nitrocelulosa. **(A)** Visualización de bandas correspondientes a BSA (1, 10 y 20 µg de proteína total), células HEK 293T (50 µg de proteína total) y muestra de timo (100 µg de proteína total) tras la separación por SDS-PAGE. **(B)** Detección de bandas de BSA (1, 10 y 20 µg de proteína total) y células HEK293T (50 µg de proteína total) después de la electroforesis y la posterior transferencia húmeda.

La tinción de la membrana con rojo Ponceau no permitió detectar proteína en ninguna de las muestras. Una explicación plausible para este resultado es la combinación de una transferencia húmeda ineficiente y el umbral limitado de detección del rojo Ponceau, situado entre 2 y 30 µg de proteína. En este contexto, el empleo de la tinción con rojo Congo se plantea como una alternativa adecuada para detectar bajos niveles de proteína, dado que es un método rápido, reversible, compatible con la posterior inmunodetección y con una sensibilidad superior, capaz de detectar hasta 20 ng de proteína en membranas de nitrocelulosa y polivinilideno difluoruro (PVDF) (Wang *et al*., 2020). A pesar de que con esta tinción se detectarían niveles muy bajos

de proteínas transferidas, lo ideal es tener una alta concentración de proteína para que la inmunodetección sea óptima. En consecuencia, el siguiente objetivo se centró en la optimización integral del proceso de transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, abarcando no solo la composición del tampón, sino también otros parámetros críticos del procedimiento.

5.2.2. Optimización de la transferencia a membrana y de los anticuerpos

La capacidad de transferencia de las proteínas presentes en el gel de forma eficiente a la membrana depende de: 1) el peso molecular de las proteínas, 2) el grosor y porcentaje de acrilamida del gel, 3) el tipo de membrana, 4) la composición del tampón de transferencia, 5) la intensidad de corriente y voltaje, 6) la temperatura y 7) el tiempo de transferencia (Sule, Rivera & Gomes, 2023). En base a estos criterios, dado que el resto de las variables no eran modificables o habían sido previamente optimizadas, se procedió a establecer las condiciones óptimas de corriente, voltaje y tiempo para la transferencia semihúmeda.

El ensayo se diseñó para evaluar dos protocolos diferentes del sistema Trans-Blot Turbo. Para ello, se emplearon dos geles cargados exclusivamente con extractos de células HEK 293T (50 µg de proteína total) que se transfirieron de manera independiente bajo las condiciones: 1.3 mA y 25 V durante 7 minutos (**Figura 7A**), y 1 mA y 25 V durante 30 minutos (**Figura 7B**). La tinción de ambos geles con azul de Coomassie mostró una cantidad elevada de proteína que no se había transferido, principalmente correspondiente a proteínas de alto peso molecular. La tinción posterior de la membrana con rojo Ponceau permitió detectar bandas transferidas, siendo más evidentes las de peso molecular intermedio. Sin embargo, las proteínas de bajo peso molecular no se detectaron ni en el gel ni en la membrana. En conjunto, estos resultados indican que la transferencia fue incompleta, con una unión parcial de las proteínas a la membrana y una pérdida de proteínas de bajo peso molecular durante el proceso.

A pesar de la limitada eficiencia del procedimiento, la comparación entre las distintas condiciones empleadas indicó que la transferencia de 7 minutos de duración ofreció un rendimiento ligeramente superior a la de 30 minutos, al observarse bandas mejor definidas y de mayor nitidez (**Figura 7A**). En contraste, la transferencia de 30 minutos mostró señales de menor intensidad y nitidez (**Figura 7B**).

A su vez, dado que la mayoría de los anticuerpos primarios empleados se produjeron en conejos (*rabbit*) y no se detectaron adecuadamente en los ensayos iniciales (**Figuras 3 y 4**), se procedió a evaluar tres anticuerpos secundarios anti-rabbit conjugados a HRP de diferentes casas

comerciales (Santa Cruz *Biotechnology*, Millipore y Dako) con el fin de identificar el más adecuado para la inmunodetección. A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que, el anticuerpo de la marca Millipore mostró el mejor rendimiento, pues la detección del anticuerpo frente a Gsk3β mostró la señal más intensa de las condiciones analizadas (**Figura 7**). Aunque factores como el diseño, el número de usos o el posible deterioro de los anticuerpos pueden influir en la interacción anticuerpo primario–secundario, los datos sugieren que la concentración del anticuerpo secundario fue el factor determinante para una detección eficaz. En este sentido, la comparación entre anticuerpos diluidos 1:1000 (Santa Cruz *Biotechnology* y Millipore) y el anticuerpo diluido 1:5000 (Dako) evidenció una señal claramente superior en aquellos utilizados a mayor concentración (**Figura 7**).

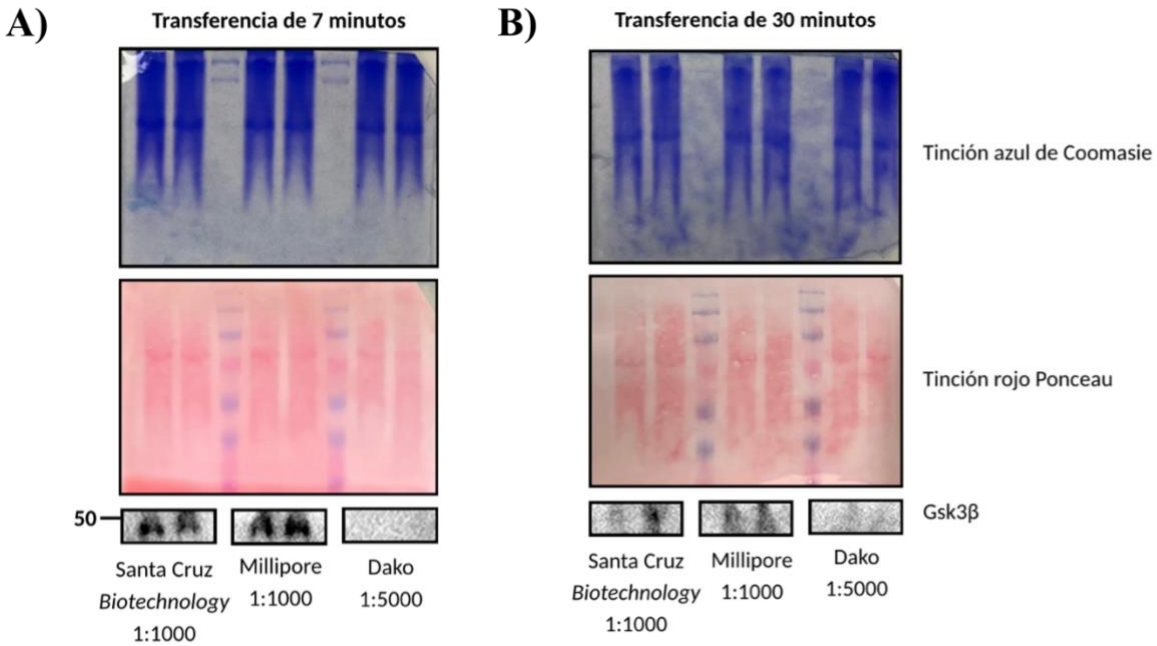


Figura 7. Evaluación de la efectividad de la transferencia semihúmeda. El extracto proteico de células HEK293T (50 µg de proteína total) se separó mediante SDS-PAGE y las bandas se detectaron por tinción con azul de Coomassie. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el sistema Trans-Blot Turbo, confirmándose la transferencia mediante tinción con rojo Ponceau. La expresión de Gsk3β se analizó por western blot empleando anticuerpos secundarios de diferentes casas comerciales: Santa Cruz *Biotechnology*, Millipore (1:1000) y Dako (1:5000). **(A)** Transferencia realizada durante 7 min a 1,3 mA y 25 V. **(B)** Transferencia realizada durante 30 min a 1 mA y 25 V.

En conjunto, la inmunodetección tras una transferencia semihúmeda de 7 minutos presentó una mayor eficacia que la obtenida a los 30 minutos. No obstante, la elevada proporción de proteínas que no se transfirieron o se perdieron durante el proceso impidió un análisis fiable de las proteínas de interés, las cuales se encuentran en un amplio rango de pesos moleculares (17–100 kDa). Como consecuencia, la limitación de la transferencia semihúmeda motivó la reevaluación

de la transferencia húmeda, introduciendo modificaciones en los parámetros de voltaje, amperaje y tiempo. En los ensayos iniciales, las transferencias se realizaron bajo la condición de 110 V constantes durante 70 minutos, generando resultados subóptimos (**Figuras 3 y 4**).

Posteriormente, se evaluó una condición de transferencia de 400 mA constantes durante 45 minutos. Para ello, se analizó un extracto proteico de timo (100 µg de proteína total) y una muestra de células HEK 293T (50 µg de proteína total). Tras la transferencia, la tinción del gel con azul de Coomassie no mostró proteínas residuales, mientras que la tinción de la membrana con rojo Ponceau reveló bandas en ambas muestras, con mayor intensidad en la muestra celular. En concordancia con estos resultados, la imunodetección de α-tubulina mostró una única banda ancha correspondiente a su elevada expresión en las células HEK 293T (**Figura 8**).

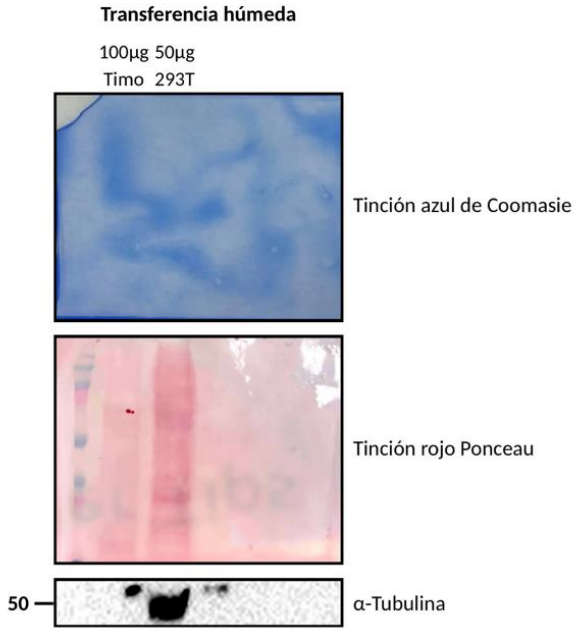


Figura 8. Evaluación de la efectividad de la transferencia húmeda con parámetros de corriente modificados. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron por tinción con azul de Coomassie. La correcta transferencia a membrana de nitrocelulosa se confirmó mediante tinción con rojo Ponceau tras la optimización del protocolo de transferencia húmeda. La expresión de α-tubulina se analizó por western blot.

En conjunto, estos resultados indican que la transferencia proteica fue eficiente, dado que no se observaron proteínas retenidas en el gel. No obstante, aunque se cargó una mayor cantidad de proteína total en la muestra de timo (100 µg) que en la de células (50 µg), la tinción con rojo Ponceau detectó mayores niveles de proteína en las células.

Esta diferencia en la expresión proteica observada entre ambas muestras puede atribuirse a la elevada heterogeneidad del timo en comparación con la muestra celular. El timo es un órgano altamente diverso desde el punto de vista celular y molecular, caracterizado por un elevado contenido proteico, pero también por una abundante presencia de lípidos, carbohidratos y ácidos

nucleicos. Además, es un órgano con una gran irrigación sanguínea, por lo que al extraer las proteínas se obtuvieron lisados sanguinolentos. Por tanto, pese a haberse cargado una mayor cantidad de proteína total procedente del timo, es probable que la presencia de sangre en los extractos proteicos y la gran heterogeneidad de este órgano desvirtuasen los valores de absorbancia obtenidos durante la cuantificación proteica mediante el ensayo BCA (Reichelt *et al*., 2016). A su vez, se ha descrito que el método BCA es sensible a la composición aminoacídica, la cual varía según el tipo celular, y que la presencia de componentes no proteicos puede interferir con la reacción de reducción de los iones cobre (Cu^{2+}) (Brady & Macnaughtan, 2015). Estas interferencias pueden conducir a una sobrestimación de la concentración proteica, lo que se traduce en una menor cantidad real de proteína cargada en el ensayo.

5.3. Evaluación de la expresión de proteínas asociadas a la vía de oxidación en ratones tratados con κ-CGN tras la optimización del protocolo western blot

Tras ajustar y optimizar adecuadamente el protocolo de western blot, se procedió a analizar nuevamente la expresión de proteínas asociadas a la vía oxidativa en muestras de timo de ratones macho y hembra tras la administración de κ-CGN.

El tratamiento de κ-CGN indujo un patrón diferencial en las proteínas reguladoras de la ruta antioxidante en machos (**Figura 9**). Con relación a la expresión de Nrf2, el regulador central de la respuesta antioxidante, no se detectaron niveles cuantificables en las muestras de timo. Con la finalidad de tener un control de la señal de los anticuerpos empleados se utilizó un lisado proteico de la línea celular HEK 293T. En contraste a los niveles de Nrf2 en el timo, en las células HEK 293T se observó una banda de baja intensidad tras un periodo prolongado de exposición (**Figura 9A**). Esta diferencia puede atribuirse, en primer lugar, a las características intrínsecas de la regulación de Nrf2, una proteína altamente lábil cuyos niveles están estrictamente regulados por un sistema de degradación mediado por el proteasoma, lo que dificulta su detección. En este sentido, se ha descrito que Nrf2 presenta una vida media inferior a 10 minutos en condiciones basales y de aproximadamente 40 minutos bajo OS (McMahon *et al*., 2004). Adicionalmente, la detección de Nrf2 en células HEK 293T, pero no en el tejido tímico murino, podría estar relacionada con diferencias antigénicas interespecíficas. Aunque el proveedor indica que el anticuerpo anti-Nrf2 reconoce la proteína murina, este ha sido generado frente a la isoforma humana, por lo que la señal limitada observada en los grupos experimentales podría deberse a una menor afinidad del anticuerpo por Nrf2 murina (Kemmerer *et al*., 2015). En conjunto, estos factores podrían explicar la ausencia de señal detectable de Nrf2 en el tejido tímico analizado.

Por su parte, la cuantificación de Keap1 mostró niveles de expresión proteica comparables entre el grupo control (media = 80,01) y el grupo tratado con κ-CGN (media = 77,46), con valores ligeramente superiores en el grupo control, aunque sin alcanzar significación estadística (t = 0,093; p = 0,929) (**Figura 9B**). Esta tendencia podría ser indicativa de un entorno oxidante asociado a la generación de ROS en respuesta a la exposición a κ-CGN. En este contexto, una menor expresión de Keap1 implicaría una reducción de la inhibición sobre Nrf2 y, consecuentemente, una mayor estabilización y acumulación nuclear del factor, favoreciendo la activación de genes implicados en la respuesta antioxidante.

En concordancia con esta observación, la expresión relativa de la enzima detoxificante Nqo1 fue mayor en el grupo tratado (media = 186,3) en comparación con el control (media = 61,27) (**Figura 9B**), aunque nuevamente esta diferencia no fue estadísticamente significativa (t = 0,943; p = 0,413) debido a la elevada variabilidad entre réplicas experimentales. Este posible incremento se podría asociar con un microambiente oxidante que promovería la activación transcripcional de enzimas implicadas en la reducción de quinonas y la atenuación de la producción de ROS. No obstante, futuros experimentos incluyendo más animales por grupo experimental podrían ser necesarios para dilucidar estas posibles diferencias.

De forma similar, Akr1c3 presentó niveles de expresión superiores en el tratamiento con κ-CGN (media = 168) frente al control (media = 89,35), lo que es compatible con la inducción de una respuesta antioxidante compensatoria frente al tratamiento, mediada por la reducción de aldehídos y cetonas potencialmente reactivas (**Figura 9B**). Esta diferencia nuevamente tampoco fue estadísticamente significativa (t = 1,718; p = 0,173).

Por último, la expresión de G6pd no pudo ser cuantificada ni sometida a análisis estadístico debido a la imposibilidad de normalización frente al control de carga β-actina (**Figura 9A**). Aunque la señal del western blot sugiere una mayor expresión en el grupo control en comparación con el tratado, estos resultados no pueden interpretarse de forma concluyente sin una adecuada corrección por carga proteica.

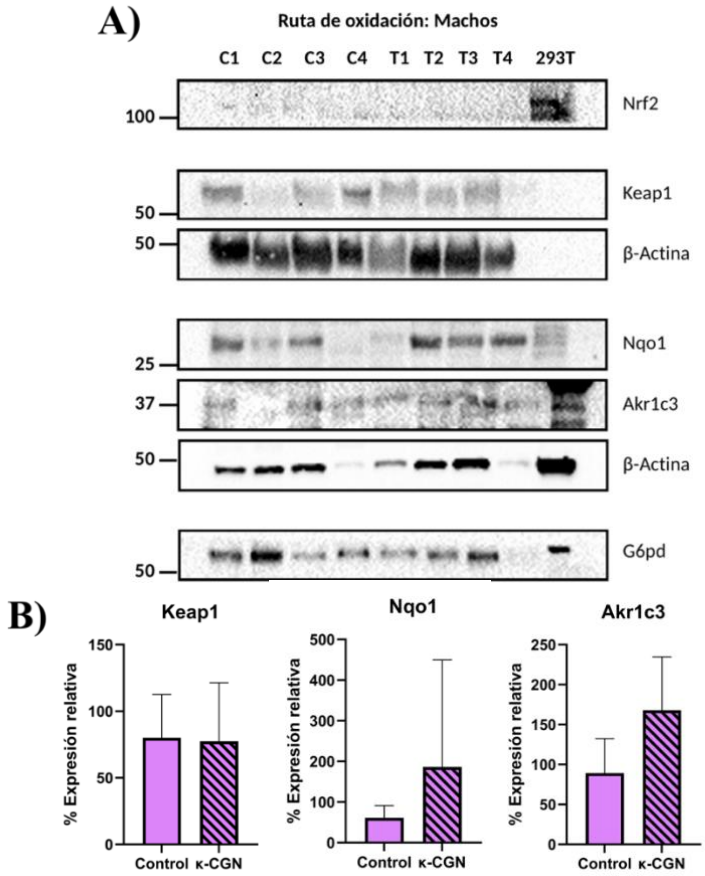


Figura 9. Análisis de expresión de mediadores de la ruta de oxidación en ratones macho. (A) Expresión proteica de Nrf2, Nqo1, Akr1c3 y G6pd en células HEK 293T y en timo de ratones macho jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante western blot. Expresión también de la proteína Keap1 únicamente en timo de ratones macho jóvenes tras la administración de κ-CGN, mediante western blot. Se empleó β-actina como control de carga correspondiente a cada una de las diferentes membranas. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de las proteínas Keap1, Nqo1 y Akr1c3 respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N=4. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test paramétrico t de Student para muestras independientes. *p* = no significativo.

En conjunto, y a pesar de las limitaciones técnicas y de la gran variabilidad observada en este tejido, los resultados obtenidos sugieren que la exposición a κ-CGN podría inducir un entorno prooxidante en el timo de ratones macho, evidenciado por una tendencia al aumento en la expresión de proteínas citoprotectoras y antioxidantes en los animales tratados. No obstante, y como se ha señalado anteriormente, futuros experimentos intentando dilucidar la existencia de estas diferencias son necesarios.

En línea con esta con esta hipótesis, Bhattacharyya, Dudeja y Tobacman (2008) demostraron un aumento significativo en la producción de ROS en células humanas tras la exposición a CGN durante 1, 4 y 24 horas. Este efecto se asoció con un aumento en la expresión de diversas enzimas implicadas en la homeostasis redox, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), la

glutatión sintetasa, la selenoproteína S, la sulfiredoxina y la TXN, así como con una disminución de la actividad de la enzima prooxidante NADH oxidasa (Bhattacharyya, Dudeja & Tobacman, 2008).

Conviene señalar que Ariño-Sinusía (2025) observó una activación de la respuesta antioxidante en el corazón de ratones macho, evidenciada por un incremento en la expresión de la proteína Akr1c3 en los animales tratados con κ-CGN en comparación con los controles. A pesar de que esta diferencia no alcanzó significación estadística en el análisis del hígado, estos resultados respaldan la noción de que el CGN podría inducir un entorno oxidante, mediado por un aumento en la generación de ROS (Ariño-Sinusía, 2025).

Paralelamente, la expresión de proteínas de la vía Nrf2 en hembras también se modificó tras la administración de κ-CGN (**Figura 10**). Inicialmente, el grupo tratado contaba con dos muestras de timo (T1 y T2); sin embargo, la baja concentración de proteína total en T1, reflejada en las bandas de β-actina, permitió cuantificar únicamente la muestra T2 (N=1). Por ello, no se han calculado promedios ni desviaciones estándar, y solo se discuten los resultados del efecto del tratamiento con κ-CGN de la muestra T2.

En primer lugar, la proteína Nrf2 mostró una banda tenue en la muestra C4 y una banda de mayor intensidad en la muestra procedente de células HEK 293T, detectándose también una leve expresión en el resto de las réplicas del grupo control. La expresión general de Nrf2 es baja, lo que requirió un tiempo de exposición prolongado para su visualización, que como se discutió con anterioridad se debe, probablemente a la rápida degradación de la proteína y a las diferencias interespecíficas de Nrf2 en lo relativo a la afinidad o especificidad del anticuerpo utilizado frente a Nrf2 (**Figura 10A**).

La cuantificación de Keap1 reveló un aumento de expresión en la muestra expuesta a κ-CGN (211,02) en comparación con el grupo control (media = 162,8), sugiriendo una mayor inhibición de Nrf2 en T2 mediante la poliubiquitinación y degradación proteosamal (**Figura 10B**). No obstante, la desviación estándar del grupo control es alta, indicando una gran heterogeneidad en las distintas muestras.

En concordancia con la regulación negativa ejercida por Keap1 sobre Nrf2, cabría esperar una disminución en la expresión de las proteínas citoprotectoras tras la exposición a κ-CGN. En este sentido, los niveles de Akr1c3 en la muestra tratada (119,21) fueron inferiores a los observados en el grupo control (media = 193,22). De manera similar, la enzima G6pd mostró una menor expresión relativa en la muestra experimental (73,5) respecto a las muestras no

tratadas (media = 97,78). Estos resultados parecen concordar con los mayores niveles de Keap1 observados y podrían reflejar una disminución de la respuesta antioxidante ante la administración de κ-CGN en el ratón hembra T2 (**Figura 10B**). En contraposición a esto, la proteína Nqo1 presentó niveles de expresión marcadamente mayores tras la administración de κ-CGN (4535,33) en relación con el grupo control (media = 53,54) (**Figura 10B**). Cabe destacar que la transcripción de Nqo1 puede producirse de manera independiente del estado redox celular, a través de su regulación por el receptor de hidrocarburos arilo (AhR) y por factores de transcripción como c-Jun, Jun-B y Jun-D, los cuales participan en la respuesta a xenobióticos o compuestos exógenos, como el κ-CGN. Adicionalmente, la expresión de Nqo1 contribuye, entre otras funciones, a la modulación de la respuesta inmunitaria y a la diferenciación linfocitaria, aspectos de especial interés en órganos inmunitarios primarios como el timo. (Nioi & Hayes, 2004).

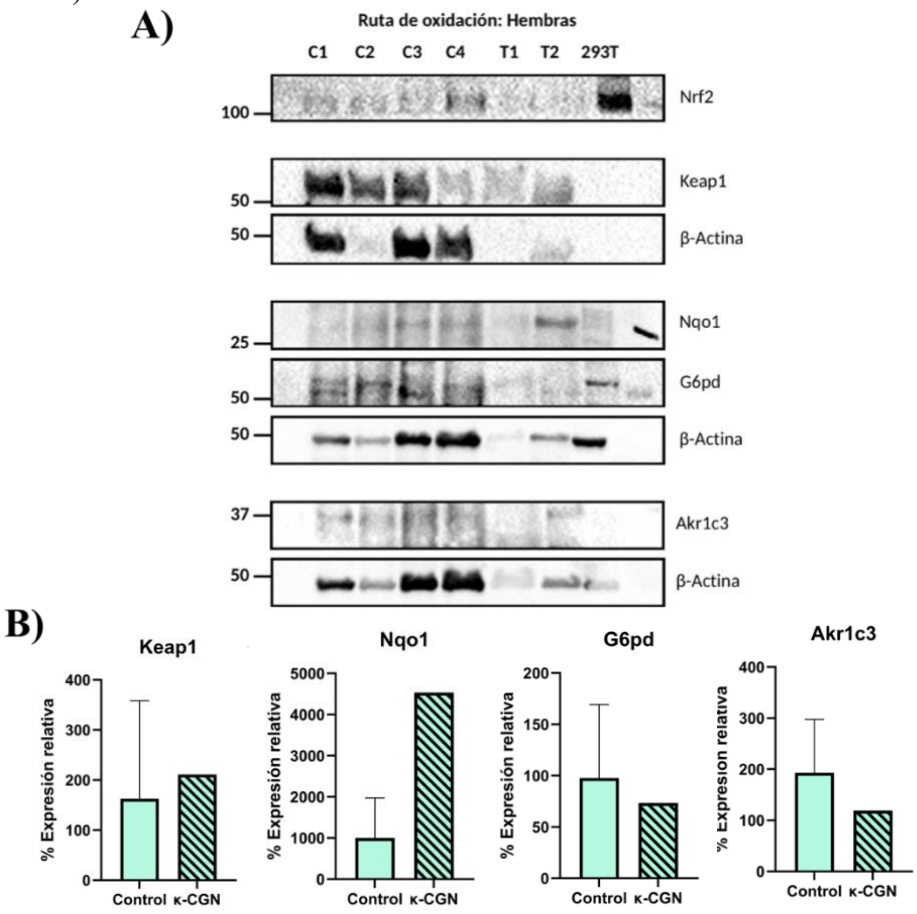


Figura 10. Análisis de expresión de mediadores de la ruta de oxidación en ratones hembra. (A) Expresión proteica de Nrf2, Keap1, Nqo1, Akr1c3 y G6pd en timo de ratones hembra jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante western blot. Expresión también de la proteína Keap1 únicamente en timo de ratones hembra jóvenes tras la administración de κ-CGN, mediante western blot. Se empleó β-actina como control de carga correspondiente a cada una de las diferentes membranas. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de las proteínas Keap1, Nqo1, G6pd y Akr1c3 respecto al grupo control. Los controles (N=4) se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM), mientras que en el tratamiento (N=1) solo se representó el valor relativo de T2.

En conjunto, los resultados obtenidos, aunque limitados y no concluyentes, podrían sugerir la ausencia de una respuesta de toxicidad oxidativa en el timo de ratones hembra tras la exposición a κ-CGN.

Este patrón contrasta con lo observado en ratones macho, en los que el κ-CGN podría actuar como un promotor de la producción de ROS, poniendo de manifiesto un claro dimorfismo sexual en la respuesta al aditivo. En este sentido, el estudio de Félix *et al*. (2024) describió por primera vez diferencias dependientes del sexo en el daño inducido por el CGN, evidenciando que las hembras jóvenes presentan un sistema inmunitario basal más robusto que los machos y, en consecuencia, una mayor resistencia frente a xenobióticos como el CGN (Félix *et al*., 2024).

Si bien dicho trabajo señala que esta resistencia podría disminuir con la edad, el modelo experimental empleado en el presente estudio se limitó a ratones de dos meses, lo que podría explicar la ausencia de alteraciones oxidativas detectables. Dada la estrecha interrelación entre las respuestas inflamatoria y oxidativa, así como su potenciación mutua, la falta de activación de los efectores de la vía de Nrf2 en el timo de hembras tratadas con κ-CGN podría estar directamente relacionada con el estado funcional y basalmente protegido del sistema inmunitario en este órgano.

En contraposición a los resultados obtenidos, Ariño-Sinusía (2025) evidenció un aumento significativo en los niveles de G6pd en las hembras expuestas a κ-CGN, tanto a nivel cardíaco, como hepático. Los resultados respaldan el papel del κ-CGN como inductor de ROS y ponen de manifiesto la diferencia de expresión proteica entre órganos, debido a la variabilidad molecular y celular de estos (Ariño-Sinusía, 2025).

Por otra parte, el análisis de la expresión de las proteínas implicadas en la vía de Nf-κb no pudo completarse debido al limitado tiempo disponible, una vez finalizada la optimización de la técnica y el estudio de la vía de Nrf2. No obstante, la evidencia disponible respalda de manera consistente la capacidad del CGN para inducir una respuesta inflamatoria y activar sus principales mediadores, lo que ha contribuido a cuestionar la supuesta inocuidad de este aditivo. En este sentido, el estudio de Bhattacharyya, Dudeja y Tobacman (2008) no solo evaluó la expresión de proteínas implicadas en la respuesta antioxidante, sino que también analizó la activación de moléculas proinflamatorias. Los autores demostraron un incremento significativo de los niveles de prostaglandina E2 y de NF-κB en células humanas, mediado por la fosforilación de IκBα, lo que favorece la translocación nuclear de NF-κB y la subsecuente expresión de interleucinas proinflamatorias (Bhattacharyya, Dudeja & Tobacman, 2008). En la

misma línea, Bhattacharyya *et al*. (2017) observaron un agravamiento del estado clínico de pacientes con CU expuestos a CGN, caracterizado por un perfil inflamatorio exacerbado y un aumento en la frecuencia de recaídas (Bhattacharyya *et al*., 2017).

De manera concordante, el análisis de los efectores de la respuesta inflamatoria Nf-κb e Il-1β en la investigación de Ariño-Sinusía (2025) mostró una mayor expresión de los mismos, aunque no significativa estadísticamente, en el corazón de los machos tratados. Además, se observó una mayor activación de la Il-1β (madura) en el hígado de las hembras tratadas. Estos resultados son consistentes con la implicación del κ-CGN en la activación de la respuesta inflamatoria (Ariño-Sinusía, 2025).

A la luz de los estudios *in vitro* e *in vivo* que documentan el potencial inflamatorio del CGN, y considerando además la capacidad de este polisacárido para inducir la activación del inflamasoma NLRP3 a través de la producción de ROS, se puede deducir que la administración continuada de κ-CGN en el modelo experimental del presente estudio favorecería un incremento en el timo de los niveles de mediadores inflamatorios como Nf-κb e Il-1β (Lopes *et al*., 2020). Este efecto sería más predominante en ratones macho, en consonancia con el dimorfismo sexual observado en la respuesta antioxidante al aditivo.

5.4. Limitaciones del estudio

En el presente estudio se identificaron diversas limitaciones que impidieron la evaluación completa de los objetivos planteados inicialmente. En primer lugar, la elevada heterogeneidad celular y molecular del timo, junto con el reducido número de réplicas experimentales, generó una alta variabilidad entre las muestras. Esta circunstancia se tradujo en desviaciones elevadas, dificultando la obtención de significación estadística e incluso la realización de análisis descriptivos en determinados grupos experimentales, como ocurrió en las hembras tratadas (N=1), lo que condicionó la interpretación y discusión de los resultados.

Además, la presencia de errores iniciales en el protocolo de western blot hizo necesaria una optimización completa de la técnica, lo que supuso una reestructuración del tiempo disponible para el análisis experimental de las muestras. Como consecuencia, no fue posible evaluar la activación de la respuesta inflamatoria mediada por Nf-κb tras la administración de κ-CGN. Asimismo, habría sido de interés analizar mediadores implicados en la regulación cruzada entre las vías Nrf2 y Nf-κb, con el fin de profundizar en los mecanismos de interconexión entre los procesos oxidantes e inflamatorios.

5.5. Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Este estudio evalúa los efectos del κ-CGN sobre vías de señalización relacionadas con en el estrés oxidativo y la inflamación en el timo murino, contribuyendo al ODS 3 (Salud y Bienestar) mediante el análisis del impacto de aditivos de uso habitual en la dieta.

La identificación de diferencias dependientes del sexo en la respuesta al κ-CGN resalta la necesidad de integrar esta variable en la evaluación del riesgo, favoreciendo una aproximación más equitativa, en línea con el ODS 10 (Reducción de las Desigualdades).

Asimismo, los resultados apoyan una revisión crítica del uso de aditivos en UPFs, promoviendo prácticas de nutrición y de hábitos sostenibles, en consonancia con los ODS 2 (Nutrición Adecuada) y 12 (Producción y Consumo Responsables).

6. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas durante la realización del presente Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

- Las condiciones óptimas para la visualización de las proteínas efectoras de la ruta antioxidante Nrf2 en extractos proteicos de timo mediante western blot se basan en el empleo de una transferencia húmeda a un amperaje constante de 400 mA durante 45 minutos.
- La administración oral de κ-CGN indujo en el timo de ratones macho una regulación al alza de las proteínas efectoras asociadas a la vía antioxidante Nrf2 en comparación con los ratones no tratados.
- El tratamiento con κ-CGN desencadenó en el timo de ratones hembra una menor expresión de proteínas efectoras de la ruta antioxidante Nrf2 respecto a las hembras control con excepción de la proteína Nqo1.
- Las diferencias observadas en la activación de la vía antioxidante Nrf2 tras la exposición a κ-CGN ponen de manifiesto un marcado dimorfismo sexual en ratones jóvenes.

7. Bibliografía

Adinolfi, S., Patinen, T., Jawahar Deen, A., Pitkänen, S., Härkönen, J., Kansanen, E., Küblbeck, J., & Levonen, A. L. (2023). The KEAP1-NRF2 pathway: Targets for therapy and role in cancer. Redox Biology, 63. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2023.102726

Ariño-Sinusía, G. (2025) Determinación del efecto de la ingesta de k-carragenano sobre las vías de Nf-kb y Nrf2 en órganos de ratones jóvenes [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Europea de Madrid.

Backman, L., & Persson, K. (2018). The No-Nonsens SDS-PAGE. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1721, 89–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4_8

Bellanti, F., Coda, A. R. D., Trecca, M. I., lo Buglio, A., Serviddio, G., & Vendemiale, G. (2025). Redox Imbalance in Inflammation: The Interplay of Oxidative and Reductive Stress. Antioxidants 2025, Vol. 14, Page 656, 14(6), 656. https://doi.org/10.3390/ANTIOX14060656

Bhattacharyya, S., Dudeja, P. K., & Tobacman, J. K. (2008). Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1780(7–8), 973–982. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.019

Bhattacharyya, S., Shumard, T., Xie, H., Dodda, A., Varady, K. A., Feferman, L., Halline, A. G., Goldstein, J. L., Hanauer, S. B., & Tobacman, J. K. (2017). A randomized trial of the effects of the no-carrageenan diet on ulcerative colitis disease activity. Nutrition and Healthy Aging, 4(2), 181–192. https://doi.org/10.3233/NHA-170023

Blancher, C., & Cormick, R. M. (2012). Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Denaturing Gel Electrophoresis and Western Blotting Techniques. Methods in Molecular Biology, 878, 89–110. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_6

Borsani, B., de Santis, R., Perico, V., Penagini, F., Pendezza, E., Dilillo, D., Bosetti, A., Zuccotti, G. V., & D'auria, E. (2021). The Role of Carrageenan in Inflammatory Bowel Diseases and Allergic Reactions: Where Do We Stand? Nutrients, 13(10). https://doi.org/10.3390/NU13103402

Brady, P. N., & Macnaughtan, M. A. (2015). Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. Analytical Biochemistry, 491, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.08.027

Castellanos-Serra L., Paz-Lago D. (2002). Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments. Electrophoresis, 23(11), 1745–1753. https://doi.org/10.1002/1522-2683(200206)23:11<1745::AID-ELPS1745>3.0.CO;2-A

David, S., Fahoum, L., Rozen, G., Shaoul, R., Shpigelman, A., Meyron-Holtz, E. G., & Lesmes, U. (2019). Reply to the Comment on "Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods?" by M. Weiner and J. McKim, Food Funct., 2019, 10: DOI: 10.1039/C8FO01282B. Food & Function, 10(3), 1763–1766. https://doi.org/10.1039/C9FO00018F

David, S., Shani Levi, C., Fahoum, L., Ungar, Y., Meyron-Holtz, E. G., Shpigelman, A., & Lesmes, U. (2018). Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods? Food & Function, 9(3), 1344–1352. https://doi.org/10.1039/C7FO01721A

Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. v., & Canning, P. (2017). Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics, 617, 84–93. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.08.005

Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501(1), 116–123. https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.019

Fahoum, L., Moscovici, A., David, S., Shaoul, R., Rozen, G., Meyron-Holtz, E. G., & Lesmes, U. (2017). Digestive fate of dietary carrageenan: Evidence of interference with digestive proteolysis and disruption of gut epithelial function. Molecular Nutrition & Food Research, 61(3). https://doi.org/10.1002/MNFR.201600545

Félix, J., Bellanco, A., Díaz-Del Cerro, E., Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T., & de la Fuente, M. (2024). High exposure to carrageenan in young mice may impair behavior, immunity, redox and inflammatory states throughout the aging process. Food Research International, 197(Pt 1). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115143

Food & Drug Administration. (n.d.). Carrageenan and salts of carrageenan (Inventory of Food Contact Substances Listed in 21 CFR).

https://hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=IndirectAdditives&id=CARRAGEENANANDSALTSOFCARRAGEENAN

Herb, M., Gluschko, A., & Schramm, M. (2021). Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9. https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.716406

Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. Advances in Biological Regulation, 65, 5–15. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003

Hester, A. K., Semwal, M. K., Cepeda, S., Xiao, Y., Rueda, M., Wimberly, K., Venables, T., Dileepan, T., Kraig, E., & Griffith, A. v. (2022). Redox regulation of age-associated defects in generation and maintenance of T cell self-tolerance and immunity to foreign antigens. Cell Reports, 38(7). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110363

Jabeen, F., Zil-E-Aimen, N., Ahmad, R., Mir, S., Awwad, N. S., & Ibrahium, H. A. (2025). Carrageenan: structure, properties and applications with special emphasis on food science. RSC Advances, 15(27), 22035. https://doi.org/10.1039/D5RA03296B

Kemmerer, Z. A., Ader, N. R., Mulroy, S. S., & Eggler, A. L. (2015). Comparison of human Nrf2 antibodies: A tale of two proteins. Toxicology Letters, 238(2), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.004

Klöting, I., Nitschke, C., & van den Brandt, J. (2003). Impact of genetic profiles on experimental studies: Outbred versus wild rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 189(1), 68–71. https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00099-1

Lee, D. Y., & Chang, G. D. (2009). Electrolytic reduction: modification of proteins occurring in isoelectric focusing electrophoresis and in electrolytic reactions in the presence of high salts. Analytical Chemistry, 81(10), 3957–3964. https://doi.org/10.1021/AC900281N

Lopes, A. H., Silva, R. L., Fonseca, M. D., Gomes, F. I., Maganin, A. G., Ribeiro, L. S., Marques, L. M. M., Cunha, F. Q., Alves-Filho, J. C., Zamboni, D. S., Lopes, N. P., Franklin, B. S., Gombault, A., Ramalho, F. S., Quesniaux, V. F. J., Couillin, I., Ryffel, B., & Cunha, T. M. (2020). Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. Cell Communication and Signaling : CCS, 18(1). https://doi.org/10.1186/S12964-020-00621-X

McKim, J. M. (2014). Food additive carrageenan: Part I: A critical review of carrageenan in vitro studies, potential pitfalls, and implications for human health and safety. Critical Reviews in Toxicology, 44(3), 211–243. https://doi.org/10.3109/10408444.2013.861797

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. Journal of Biological Chemistry, 279(30), 31556–31567. https://doi.org/10.1074/jbc.M403061200

Nioi, P., & Hayes, J. D. (2004). Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 555(1-2 SPEC. ISS.), 149–171. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.05.023

Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1(4). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A000034

Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature, 401(6748), 82–85. https://doi.org/10.1038/43466

Pagliai, G., Dinu, M., Madarena, M. P., Bonaccio, M., Iacoviello, L., & Sofi, F. (2021). Consumption of ultra-processed foods and health status: a systematic review and meta-analysis. The British Journal of Nutrition, 125(3), 308–318. https://doi.org/10.1017/S0007114520002688

Penning, T. M. (2017). Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 27(12), 1329–1340. https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1379503

Rabilloud, T. (2010). Variations on a theme: Changes to electrophoretic separations that can make a difference. Journal of Proteomics, 73(8), 1562–1572. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.04.001

Reichelt, W. N., Waldschitz, D., Herwig, C., & Neutsch, L. (2016). Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43(9), 1271–1280. https://doi.org/10.1007/S10295-016-1796-9

Rupert, R., Rodrigues, K. F., Thien, V. Y., & Yong, W. T. L. (2022). Carrageenan From Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae): Metabolism, Structure, Production, and Application. Frontiers in Plant Science, 13. https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.859635

Sellem, L., Srour, B., Javaux, G., Chazelas, E., Chassaing, B., Viennois, E., Debras, C., Druesne-Pecollo, N., Esseddik, Y., de Edelenyi, F. S., Arnault, N., Agaësse, C., de Sa, A., Lutchia, R., Huybrechts, I., Scalbert, A., Pierre, F., Coumoul, X., Julia, C., … Touvier, M. (2024). Food additive emulsifiers and cancer risk: Results from the French prospective NutriNet-Santé cohort. PLOS Medicine, 21(2), e1004338. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1004338

Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. v. (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. BioTechniques, 75(3), 99–114. https://doi.org/10.2144/BTN-2022-0034

Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. The Journal of Clinical Investigation, 107(1), 7–11. https://doi.org/10.1172/JCI11830

Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. Thoracic Surgery Clinics, 29(2), 123–131. https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001

Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxidants & Redox Signaling, 29(17), 1727–1745. https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7342

Wang, J. L., Zhao, L., Li, M. Q., Chen, W. G., & Xu, C. J. (2020). A sensitive and reversible staining of proteins on blot membranes. Analytical Biochemistry, 592. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113579

Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., & Liu, G. (2022). Food additives: From functions to analytical methods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62(30), 8497–8517. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1929823

Yermak, I. M., Barabanova, A. O., Aminin, D. L., Davydova, V. N., Sokolova, E. v., Solov'Eva, T. F., Kim, Y. H., & Shin, K. S. (2012). Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities. Carbohydrate Polymers, 87(1), 713–720. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.053

Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Filipič, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G. G., Lambré, C., Leblanc, J. C., Lillegaard, I. T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., … Dusemund, B. (2018). Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives. EFSA Journal, 16(4), e05238. https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2018.5238

Zhao, M., Sun, L., Fu, X., & Gong, X. (2010). Influence of ionic strength, pH, and SDS concentration on subunit analysis of phycoerythrins by SDS-PAGE. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(4), 1065–1079. https://doi.org/10.1007/S12010-010-8930-3

Zhong, H., Ma, M., Yu, G., & Shang, Q. (2025). How proinflammatory oligosaccharides are produced from carrageenan in mammalian gut? Key roles of Bacteroides xylanisolvens, Bacteroides zhangwenhongii, and Bacteroides difficilis. International Journal of Biological Macromolecules, 328(Pt 2). https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.147694.

ANEXO I. ABREVIATURAS

ARE: elementos de respuesta antioxidante (del inglés, "*antioxidant response elements*").

AKR1C3/Akr1c3: aldo-keto reductasa familia 1 miembro C3.

AKT/Akt: proteína quinasa B (del inglés, "*AKR thymoma kinase*").

BCA: ácido bicinconínico (del inglés, "*bicinconinic acid*").

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés, "*bovine serum albumin*").

CGN: carragenina, carragenano o carragenato.

CU: colitis ulcerosa.

d-CGN: carragenano degradado.

E-407: aditivo alimentario.

ECL: quimioluminiscencia mejorada (del inglés, "*enhanced chemiluminescence*").

EFSA: autoridad Europea de seguridad alimentaria (del inglés, "*European food safety authority*").

FCS: suero fetal bovino (del inglés, "*foetal calf serum*").

FDA: administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (del inglés, "*food and drug administration*").

GRAS: generalmente reconocido como seguro (del inglés, "*generally recognized as safe*").

G6PD/G6pd: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (del inglés, "*glucose-6-phosphate dehydrogenase*").

GSH: glutatión reducido (del inglés, "*glutathione reduced*").

GSK3β/Gsk3β: glicógeno sintasa quinasa-3 beta (del inglés, "*glycogen synthase kinase-3 beta*").

HRP: peroxidasa de rábano picante (del inglés, "*horseradish peroxidase*").

IKK: complejo IκB quinasa (del inglés, "*IκB kinase complex*").

IL-1β/Il-1β: interleucina-1 beta.

IL-6/Il-6: interleucina-6.

IκB: inhibidor kappa B.

KEAP1/Keap1: proteína 1 asociada a ECH con dominios tipo Kelc (del inglés, "*Kelch-like ECH- associated protein 1*").

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (del inglés, "*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*").

NIH: Institutos Nacionales de Salud (del inglés, "*National Institutes of Health*").

NLRP3: receptor tipo NOD con dominio pirina 3 (del inglés, "*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*").

NF-κB/Nf-κb: factor nuclear kappa B (del inglés, "*nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells*").

NQO1/Nqo1: NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1.

NRF2/Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado 2 (del inglés, "*nuclear factor erythroid 2–related factor 2*").

PBS: solución salina tamponada (del inglés, "*phosphate buffered saline*").

PI3K/Pi3k: fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, "*phosphoinositide 3-kinase*").

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (del inglés, "*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*").

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (del inglés, "*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*").

p-AKT/p-Akt: proteína quinasa B fosforilada.

p-GSK3β/p-Gsk3β: glicógeno sintasa quinasa-3 beta fosforilada.

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés, "*reactive oxygen species*").

SDS: dodecil sulfato sódico (del inglés, "*sodium dodecyl sulfate*").

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés, "*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*").

SEM: error estándar de la media (del inglés, "*standard error of the mean*").

sMaf: proteínas de fibrosarcoma musculoaponeurótico pequeñas (del inglés "*small musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins*").

TBS-T: *buffer* salino tamponado con Tween-20 (del inglés, "*Tris-buffered saline with Tween-20*").

TLRs: receptores tipo Toll (del inglés, "*Toll-like receptor*").

TXN: tiorredoxina.

t-AKT/t-Akt: proteína quinasa B total.

t-NF-κB/t-Nf-κb: factor nuclear kappa B total.

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés, "*tumor necrosis factor*").

TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral (del inglés, "*tumor necrosis factor receptor 1*").

UPF: alimentos ultraprocesados (del inglés "*ultra-processed foods*").