

“Análisis cuantitativo de la proteína
FABP1b en condiciones de inanición
y alimentado en *Danio rerio*”

Tesis de grado
Licenciatura en Biología

Mariel Flores

Julio 2012

Dra. Adriana Esteves (Tutora)

Sección Bioquímica

Facultad de Ciencias, UdelaR

INDICE

1 Resumen.....	4
2 Introducción.....	5
2.1 Ácidos grasos como nutrientes.....	5
2.2 Familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos FABP.....	6
2.3 Proteína de unión a ácidos grasos FABP1.....	8
2.4 <i>Danio rerio</i> como modelo de estudio.....	9
3 Objetivos.....	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4 Materiales y métodos.....	12
4.1 Material biológico.....	12
4.2 Preparación de lisados intestinales de peces.....	12
4.3 Dosificación de la proteína FABP1b pura.....	12
4.4 Dosificación de proteínas totales en lisados intestinales.....	13
4.5 Cuantificación de la proteína FABP1b en lisados intestinales.....	14
4.5.1 Puesta a punto de ELISA.....	14
4.5.2 ELISA no competitivo.....	15
4.5.3 ELISA competitivo.....	15
4.5.4 Western Blot cuantitativo.....	16
5 Resultados.....	17
5.1 Dosificación de la proteína FABP1b pura.....	17
5.1.1 Espectrofotometría.....	17
5.1.2 Densitometría.....	17
5.1.3 Acido bicínico.....	18
5.2 Dosificación de lisados intestinales.....	18
5.3 Puesta a punto de ELISA.....	19
5.4 ELISA no competitivo.....	20
5.5 ELISA competitivo.....	21

5.6 Western Blot.....	22
6 Discusión.....	25
7 Conclusiones.....	29
8 Bibliografía.....	30

1-RESUMEN

Los ácidos grasos digeridos durante la ingesta son absorbidos en el intestino delgado, y su transporte intracelular está mediado por proteínas transportadoras de ácidos grasos, entre las que se encuentran proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs). Estas proteínas integran una familia de nueve proteínas (en el caso de mamíferos) muy conservadas en la escala zoológica, y cada una predominante en los distintos tejidos del organismo. Son pequeñas proteínas citosólicas con una cavidad hidrofóbica en donde se unen sus ligandos.

En el intestino de los peces se encuentran tres tipos de FABPs (FABP1, FABP2 y FABP6) donde a su vez la FABP1 se divide en FABP1a, FABP1b.1 y FABP1b.2. Este trabajo se centró en las variantes de FABP1b. El modelo de estudio fue el pez *Danio rerio*, elegido por la gran cantidad de información disponible a nivel molecular y morfológica, y por sus ventajas en el momento de su cría, siendo nuestro objetivo determinar la participación de la proteína FABP1b en la absorción intestinal. Se emplearon dos grupos de peces, los peces en inanición (sacrificados a las 96 horas de alimentados), y los peces alimentados (sacrificados a las 3 horas de alimentados). Se disecaron las regiones anteriores de los intestinos y se dosificó la proteína en estudio mediante ELISA competitivo y Western blot cuantitativo.

Se determinó que la cantidad de proteína FABP1b varía con respecto a la condición alimenticia. Los resultados muestran que cuando el organismo no consume alimento, el nivel de proteína FABP1b disminuye 3,6 veces con respecto a los alimentados.

2- INTRODUCCIÓN

2.1- Ácidos grasos como nutrientes

Los alimentos proporcionan al organismo la energía y las sustancias necesarias para el mantenimiento de sus funciones vitales, así como para el crecimiento y/o reposición de sus tejidos. En la actualidad sabemos que existen alrededor de unos 50 nutrientes esenciales en la especie humana, entre los que se encuentran ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas y minerales [1]. Los lípidos son una forma muy eficiente de almacenar energía ya que su valor energético es muy elevado (9kcal/g) y claramente superior al de los hidratos de carbono (4kcal/g), y además se almacenan en un estado relativamente anhidro. Los lípidos de la dieta son los nutrientes que presentan mecanismos de digestión y absorción más complejos debido a su escasa solubilidad en el medio acuoso presente en la luz intestinal [2]. Desde el punto de vista químico, estas sustancias pertenecen a un grupo muy heterogéneo de compuestos (ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol) donde todos ellos presentan como característica en común la insolubilidad en agua [3].

Los lípidos de la dieta consisten de forma predominante triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. La absorción es definida como el transporte de la grasa dietaria desde el lumen intestinal al plasma, y consiste en tres grandes pasos. Primero, la grasa dietaria es emulsificada e hidrolizada en el lumen intestinal. En segundo lugar, los productos hidrolizados son captados por los enterocitos. En tercer lugar, las grasas son re-sintetizadas en enterocitos, empaquetadas en lipoproteínas y secretadas [4].

La lipólisis de los triglicéridos ingeridos comienza en el estómago por la acción de una lipasa lingual. La lipólisis intraluminal se da principalmente por enzimas pancreáticas. Los productos de la hidrólisis de los triglicéridos se solubilizan en la luz intestinal en combinación con los ácidos biliares secretados para formar *micelas mixtas*, aumentando la solubilidad de los ácidos grasos para la entrega de productos lipolíticos

a través del ambiente acuoso de la luz intestinal hasta el ribete en cepillo de los enterocitos [5]. En los vertebrados, el sitio más importante para la digestión y la absorción es el tercio proximal del intestino, en parte debido a la llegada de secreciones pancreáticas y biliares, y en parte debido a que la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio posee una abundante cantidad de enzimas digestivas y proteínas transportadoras asociadas. La absorción de los ácidos grasos resultantes de la digestión tiene lugar en gran medida por difusión simple a través de la membrana celular [6].

En los países occidentales, el 40% de las calorías consumidas provienen de los lípidos, mientras que la recomendación nutricional es de 5-10% menor [7]. Este excesivo consumo de lípidos aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad. Por esto, en los últimos años han aumentado los esfuerzos para definir mecanismos básicos por el cual el colesterol y otros lípidos son absorbidos y transportados por los enterocitos del intestino delgado [8].

2.2- Familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos FABP

Los ácidos grasos, tienen diversas funciones, ya sea como fuente de energía metabólica, biosíntesis de membranas biológicas, modificación de proteínas, regulación de la transcripción, y como moléculas de señalización. Una vez dentro de la célula, estas moléculas tendrán que superar una vez más el problema de la insolubilidad en el espacio citosólico, para su transporte entre distintos compartimentos celulares incluyendo peroxisoma, mitocondria retículo endoplasmático y núcleo [9].

Una familia específica de proteínas, las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs), tienen la capacidad de unir a ácidos grasos con alta afinidad, reduciendo considerablemente la concentración de ácidos grasos libres a una no nociva para la célula. La alta relación ácido graso/FABP (1000/1) implica un mecanismo eficiente que puede mantener el espacio celular libre de formación de micelas [10]. Las FABPs

están ampliamente distribuídas en la escala zoológica, tanto en vertebrados como en invertebrados [11, 12]. La primera FABP reportada, la FABP1 ó L-FABP, fue identificada hace cuatro décadas atrás. Desde entonces los estudios se enfocaron en distribución en tejidos, actividades de unión, y regulación de los genes de las FABPs incluyendo ratones knock out para los genes de las proteínas FABPs [13].

En vertebrados se han hallado hasta doce tipos diferentes de FABPs. Dentro de una misma especie las FABPs muestran entre 20 y 70% de identidad de secuencia, mientras que el mismo tipo de FABP entre diferentes especies de vertebrados puede mostrar hasta un 95% de identidad de secuencia [12]. Las proteínas de esta familia presentan una alta homología estructural, independiente del subtipo y especie a la que pertenezca. Esto sugiere un evento de duplicación o divergencia de un único gen ancestral [9].

Nueve genes que codifican a las FABPs se han identificado en el genoma humano; estos son *fabp* de hígado (L-FABP), de intestino (I-FABP), de corazón (H-FABP), de adipocito (A-FABP), de epidermis (E-FABP), de ileon (IL-FABP), de cerebro (B-FABP), de la mielina (M-FABP), y de testículo (T-FABP). Las distintas isoformas fueron nombradas de acuerdo al órgano en el cual fueron encontrados por primera vez o donde son predominantes, pero sus perfiles de expresión no son exclusivos a los órganos específicos [9].

Hay evidencias que demuestran que las FABPs juegan un rol importante en la captación, secuestro y transporte de ácidos grasos e interacción con otros sistemas enzimáticos y de transporte intracelular. Recientemente se las ha involucrado con el transporte de ácidos grasos hacia el núcleo para regular transcripción génica vía activación de receptores nucleares (PPAR), funciones esenciales en desarrollo temprano. Sin embargo, la función precisa de cada tipo de FABP permanece sin ser dilucidada completamente [14].

En cuanto a su estructura, todos los miembros de la familia de proteínas FABP presentan en una estructura de diez hebras β antiparalelas y dos α hélices que coronan al barril y delimitan una cavidad. La misma es un “bolsillo” hidrofóbico donde se une el ácido graso [15]. Se ha postulado que variaciones de aminoácidos en las regiones de alfa hélice podría dirigir las interacciones proteína-proteína célula específica [16].

2.3- Proteína de unión a ácidos grasos FABP1

En células intestinales de vertebrados están presentes tres miembros de la familia de proteínas FABP, la L-FABP ó FABP1, la I-FABP ó FABP2 y la IL-FABP ó FABP6. Estas proteínas difieren en la especificidad de ligando así como la capacidad de unión a ligando. Aunque estas proteínas pueden unir ácidos grasos de cadena larga, se ha reportado que la FABP1 se une también a numerosos ligandos hidrofóbicos endógenos como por ejemplo algunos fosfolípidos, sales biliares, y acyl-CoA [17]. La proteína FABP1 se encuentra en niveles elevados en tejidos con activo metabolismo lipídico, y representa entre el 2 y 5% de proteínas citosólicas en células de intestino [18].

Una característica particular de esta forma es que es la única proteína de la familia de las FABP que puede ligar dos de ellos a la vez. Este hecho se explica porque presenta un bolsillo hidrofóbico más grande, indicando una funcionalidad única en comparación con las otras proteínas de la familia. Se ha sugerido por ello que la FABP1 es la más versátil de la familia. Su alto nivel de expresión, propiedades de unión y funciones en regulación de procesos celulares (inflamación, inmunidad, metabolismo, homeostasis), demuestran la importancia de la L-FABP [9].

Se ha sugerido que ésta proteína regula la captación y transporte de ácidos grasos de cadena larga del citoplasma hasta el núcleo celular para la activación del receptor activado de proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α), ya que, como es sabido, los

ácidos grasos de cadena larga regulan la actividad transcripcional del PPARα [19]. Se ha indicado por estudios de fotoblanqueado fluorescente que la cantidad de movimiento de ácidos grasos es directamente proporcional a los niveles de FABP1 [20].

Se ha demostrado que la FABP1 facilita la entrada de ácidos grasos de cadena larga al núcleo celular mediante su unión y co-transporte [18]. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha detectado a la FABP1 en el núcleo celular del pez cebra a través de microscopía electrónica y microscopía confocal inmunofluorescente (comunicación personal). Si bien no se ha podido detectar su mecanismo de entrada, una posibilidad podría ser difusión pasiva. Esto último es basado en que el diámetro de la L-FABP es de 14KDa, y otras proteínas (citocromo C) de 13KDa logran atravesar el núcleo por difusión pasiva [19].

Por otro lado, se han hecho experimentos con ratones donde se eliminó el gen de la L-FABP, y los ácidos grasos se redirigen a tejido adiposo para su almacenamiento, y se induce ganancia de peso/obesidad [18].

Variaciones del gen *fabp1* impacta en niveles de lipoproteína/proteína en sangre; y la baja expresión de esta proteína en intestino proximal de humanos determina la existencia del síndrome de abetalipoproteinemia y enfermedad de Anderson [18].

2.4- *Danio rerio* como modelo de estudio

En los últimos veinte años *Danio rerio* (pez cebra) se ha convertido en un organismo modelo importante en investigación biológica. Criar y mantener el pez cebra es más demandante que invertebrados, pero menos que mamíferos [21]. Sus ventajas como modelo vertebrado se basan en su rápido desarrollo, la facilidad en la obtención de sus embriones y larvas las que por ser transparentes son de gran utilidad en aquellos análisis que requieren visualización de estructuras internas. Por otro lado, el genoma

de ese organismo ha sido totalmente secuenciado lo que facilita el abordaje molecular [22].

Se ha demostrado la alta potencialidad de *D. rerio* en el descifrado de la regulación transcriptómica, bioquímica y toxicológica de la fisiología digestiva. Constituye además, un modelo útil en el cual estudiar las condiciones de los síndromes humanos de absorción deficiente o la distribución de drogas lipofílicas desde la luz intestinal al sistema circulatorio [23, 24].

Hasta el momento, se han caracterizado 11 genes que codifican para FABPs en *D. rerio* [25], de los cuales tres son tipo FABP1, conocidas como FABP1a y FABP1b.1 y FABP1b.2 [26]. Los análisis filogenéticos indican que los genes de estas tres variantes son ortólogos del gen *fabp1* de mamíferos que surgieron por eventos de duplicación genómica. Aparentemente, *fabp1a* y el gen ancestral *fabp1b* surgieron en la radiación de la clase Actinopterygii, hace cerca de 400 millones de años [27], mientras que los genes *fabp1b.1* y *fabp1b.2* surgieron posteriormente [18]. No se encontraron variaciones en los niveles de ARNm de *fabp* tejido específico entre macho y hembras de pez cebra, en condiciones constantes de alimentación [25].

Los adultos del pez cebra muestran expresión diferencial en estos tres genes. *fabp1a* se expresa exclusivamente en el intestino [26], mientras que los transcritos de *fabp1b.1* han sido hallados en hígado, intestino, corazón, testículos, ovario y agallas; y de *fabp1b.2* en intestino, ovarios, piel y ojos [18]. El gen *fabp1b.1* de pez cebra ha sido clonado, expresado como proteína recombinante, y generado anticuerpo específico [26].

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo general

Profundizar en el conocimiento la participación de la proteína FABP1b en la absorción de grasas intestinales en *Danio rerio*, a través de la detección de los niveles de expresión de FABP1b en condiciones de inanición y alimentados.

3.2- Objetivos específicos

- Evaluar distintos métodos de cuantificación de proteínas para la detección de niveles de FABP1b en condición de inanición y alimentado en lisados intestinales de *Danio rerio*.
- Evaluar los niveles de la proteína FABP1b en el intestino anterior de pez cebra adulto mediante ELISA en condiciones de inanición y alimentado.
- Evaluar los niveles de la proteína FABP1b en el intestino anterior de pez cebra adulto mediante Western blot en condiciones de inanición y alimentado.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Material biológico.

El material biológico (intestino anterior) fue cedido por el Dr. F. Zolessi (protocolo aprobado por la CHEA) Los peces fueron mantenidos bajo condiciones constantes de pH, temperatura, concentración salina, y exposición a la luz. Fueron alimentados con alimento comercial (Tetramim) una vez al día, y siempre a la misma hora.

4.2 - Preparación de lisados intestinales de peces

Se generaron dos grupos de 12 peces cada uno, los sacrificados a las 3 horas de alimentados, y los sacrificados a las 96 horas de alimentados. En ambos casos los procedimientos posteriores se realizaron de la misma manera. Se homogenizó la región anterior de los intestinos disecados, totalizando 4 intestinos por muestra, contando así con tres muestras por condición. Los intestinos se homogeneizaron en eppendorf, en una solución de lisis compuesta por inhibidores de proteasas (5ug/ml de iodoacetamida y 1mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)) en buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS), mediante lisis mecánica con homogeneizador para eppendorf (Sigma). A cada muestra de 4 intestinos se le añadió 250 µl de buffer de lisis. Luego de la lisis mecánica se realizó una centrifugación a 14000 rpm durante treinta minutos. Se descartó el pellet, y el sobrenadante de cada muestra se conservó a -20°C.

4.3- Dosificación de proteína FABP 1b pura

La proteína FABP 1b pura fue cedida por la Dra. A. Esteves y se empleó como referencia en los ensayos posteriores. Se dosificó por tres métodos distintos: por espectrofotometría, por densitometría partiendo de electroforesis en gel de poliacrilamida, y por el método del ácido bicincónico (BCA PRO. Sigma).

Mediante espectrofotometría se midió la absorbancia de la proteína FABP1b pura, y posteriormente se realizó el cálculo para obtener el valor de la concentración tomando el coeficiente de extinción teórico (ϵ 2980 M⁻¹ cm⁻¹) (www.expasy.org).

Para la dosificación por densitometría, se utilizó como referencia la proteína lisozima, ya que presenta similar masa molecular. Se sembraron, en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15%, dos cantidades distintas de lisozima, 2 y 4 μ g, y 16 μ l de la proteína FABP1b. Se visualizaron las proteínas en el gel mediante tinción con azul Coomassie. La intensidad de señal se midió mediante el programa Image J [<http://imagej.nih.gov/ij>].

La dosificación mediante el método del ácido bicinónico (BCA PRO) se realizó empleando un micrométodo en placa de ELISA, utilizando dos diluciones en agua de la proteína FABP1b, 1/50 y 1/100. Para la construcción de una curva de calibración se emplearon concentraciones conocidas, en un rango que fue desde 0,5 μ g/ml hasta 30 μ g/ml, de seroalbumina bovina (BSA) diluida en agua. Para todos los casos, tanto BSA como FABP1b, cada muestra se analizó por triplicado.. En cada pocillo se sembró 150 μ l de solución proteica y 150 μ l de la solución de trabajo del kit, como blanco se empleó agua destilada.

La placa así sembrada se incubó durante una hora a 37°C, y luego se leyó la absorbancia a 550nm en lector de placas ELISA.

4.4.- Dosificación de proteínas totales en lisados intestinales

La cantidad total de las proteínas de los lisados intestinales, se determinó utilizando un kit comercial (Kit dosificación proteína sigma (BCA PRO). mediante el método del ácido bicinónico Se dosificaron dos muestras de cada condición alimenticia por triplicado y se utilizó como blanco PBS 1X. Las diluciones se realizaron en PBS 1X determinando la absorbancia de las muestras a 550nm en lector de placas ELISA.

4.5- Cuantificación de la proteína FABP 1b en lisados intestinales

Para cuantificar la proteína FABP1b en las muestras de lisados intestinales de pez cebra se utilizaron dos métodos de cuantificación: ELISA (competitivo y no competitivo) y Western blot cuantitativo.

4.5.1- Puesta a punto de ELISA

Para llevar adelante esta técnica se determinó tanto la dilución del anticuerpo contra FABP1b.1 como la cantidad óptima de proteína que permitían tener una señal detectable. Para esto se realizaron siete diluciones seriadas del anticuerpo primario, de 1/125 a 1/2000, y cantidades decrecientes seriadas de la FABP1b.1 pura. La placa se sensibilizó con 100µl de FABP1b.1 pura con las siguientes cantidades: 2,5µg hasta 0,0048µg durante toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces con PBS-T (PBS-Tween 20, 0,1%) y se bloqueó con 200µl de BSA 1% durante una hora a temperatura ambiente. Luego del bloqueo se incubó con 100µl de anticuerpo (suero purificado por afinidad, cedido por la Mag. L. Canclini) contra la proteína FABP1b.1, diluido en PBS 1X en las distintas concentraciones, durante toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces con PBS-T y se incubó con 100µl de anticuerpo contra IgG de conejo generado en cabra ligado a fosfatasa alcalina (Sigma), a una dilución de 1/20000 en PBS 1X, durante una hora a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-T y luego se lavó dos veces con dietanolamina 10mM, MgCl₂ 0,5mM a pH 9,5. Posteriormente al lavado se agregó 50µl de p-nitrofenilfosfato (pNPP) como sustrato. Se incubó durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 405nm. Se emplearon placas de ELISA de alta capacidad de unión (Greiner Bio-One).

4.5.2- ELISA no competitivo

Según los datos obtenidos en el punto anterior, elegimos un rango de concentración de proteína pura para sensibilizar la placa que nos permitiera obtener una curva de calibración adecuada, excluyendo valores de saturación. Por otro lado, también se

eligió el factor de dilución del anticuerpo primario contra FABP1b.1 que diera una señal detectable en el momento de determinar los valores de absorbancia.

Para la construcción de la curva de calibración, la placa de ELISA se sensibilizó con la proteína pura, por triplicado de la siguiente manera: 75ng hasta 9,37ng de proteína en diluciones seriadas. En cuanto al anticuerpo contra FABP1b.1, la dilución elegida fue de 1/1000. Para la cuantificación de los lisados, se sensibilizó la placa con 10µl de lisados intestinales por duplicado para cada condición alimenticia. Se realizaron dos blancos de lectura, uno consistía en pocillos sensibilizados con la proteína pura en todos los valores de dilución pero sin anticuerpo primario (sin ningún otro cambio en el procedimiento), y el otro consistía en tres pocillos sensibilizados solo con PBS. Se procedió con el protocolo de ELISA antes mencionado.

Se realizó un segundo ELISA no competitivo, igual al anterior en cuanto a protocolo y valores de proteína pura y anticuerpos, con la excepción de que se sensibilizó con 100µl de lisado intestinal únicamente de la condición sacrificado a las 96 horas de alimentado por un tema de disposición de muestras

4.5.3- ELISA competitivo

En este caso la técnica ELISA tiene algunas variaciones que permiten aumentar la sensibilidad, con respecto al ELISA no competitivo. Brevemente, la placa se sensibiliza la con la proteína pura, y luego se aplica una mezcla de anticuerpo y competidor. El competidor en la curva de calibración fue la proteína pura, y en el lisado a dosificar, el competidor fue .la proteína contenida en el mismo. Se sensibilizó la placa con 150ng de proteína pura. La curva de calibración se realizó con diez valores de proteína pura, por duplicado, que van desde 250ng a 0,95ng en diluciones al medio, seriadas y 100µl de la mezcla anticuerpo primario 1/1000 más proteína pura (con su valor correspondiente).

Para las muestras de lisados intestinales la competencia se realizó con 30µl de lisado diluido con PBS, en un volumen final de 100µl. Se utilizaron dos muestras de la condición sacrificados a las 3 horas de alimentados por duplicado. El resto del procedimiento es igual al mencionado anteriormente.

4.5.4- Western blot cuantitativo

Se sembraron, en SDS-PAGE, 200 y 400µg de lisado para cada condición. Posteriormente, se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis a una membrana de acetato de celulosa (Hybond-C Extra Amersham Biosciences) durante una hora a 4°C y 3,3mA por cm². Empleando una solución Tris 25x10⁻³ M, Glicina 192x10⁻³ M en etanol al 20%. La membrana se conservó a 4°C durante toda la noche en solución de bloqueo, (5% de leche en polvo Conaprole y 2% de glicina en buffer TBST). Se incubó la membrana con el anticuerpo generado contra FABP1b en una dilución de 1/1000 en solución de bloqueo, durante dos horas, con agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con TBST con agitación durante diez minutos cada uno. Posteriormente se incubó el anticuerpo contra IgG de conejo conjugada a peroxidasa (Sigma) 1/5000 en TBST durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron doce lavados con TBST de cinco minutos cada uno, con agitación, a temperatura ambiente e inmediatamente se reveló la membrana con un reactivo quimioluminiscente (Chemiluminescent peroxidase substrate-3 Sigma Aldrich). Pare ello se incubó durante cinco minutos con el reactivo exponiendo luego sobre ella una placa radiográfica a distintos tiempos. La intensidad de la señal se midió mediante el programa Image J.

5- RESULTADOS

5.1- Dosificación de la proteína FABP1b pura

5.1.1- Espectrofotometría

A través de la técnica de espectrofotometría obtuvimos un valor de **0,47** unidades de absorbancia (UA). Siendo el coeficiente de extinción molar de $2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 1 UA corresponde a una concentración de 0,211 gramos/litro, por lo tanto nuestra muestra tenía una concentración de **2,22 gr/l** (2,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

5.1.2- Densitometría

Se realizó una electroforesis en gel acrilamida con la proteína pura FABP1b y la proteína lisozima como referencia. Se observaron las bandas correspondientes a 2 μg y 4 μg de lisozima, y la banda de la proteína a dosificar, FABP1b, con una intensidad mayor que la banda correspondiente a los 4 μg de lisozima (Figura 1). A través del programa Image J, se realizó una lectura de intensidad de la banda problema y referencia. La concentración de la proteína problema fue de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

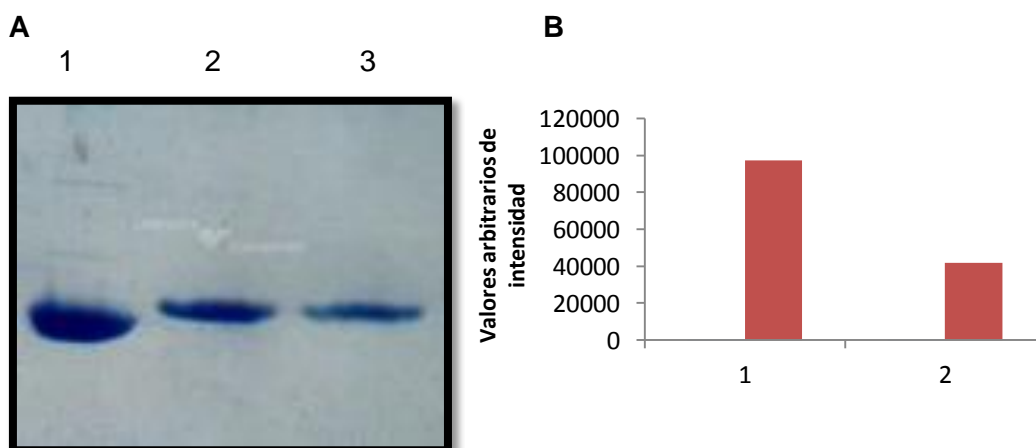


Figura 1. **Dosificación por densitometría.** A) electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 15%. Carril 1: FABP1b pura. Carriles 2 y 3: Lisozima 4 y 2 μg respectivamente. B) cuantificación mediante el programa Image J, gráfico de barras que corresponden a las muestras 1 y 2 de la electroforesis.

5.1.3- Acido bicincónico

La curva de calibración empleando como estándar la albúmina sérica bovina (BSA) tiene un rango de concentraciones de 0,5µg/ml hasta 30µg/ml (Figura 2). A partir de la ecuación de la recta de mejor ajuste ($y = 0,0178x - 0,0565$), se determinó la concentración de FABP1b. Se calcularon los valores promedio de las unidades de absorbancia de la proteína FABP1b para las dos diluciones empleadas (1/50 y 1/100) y se los sustituyeron en la ecuación de la recta. Se realizó el promedio de los valores de concentración de la proteína FABP1b de ambas diluciones, y su valor fue de **1,04µg/µl**.

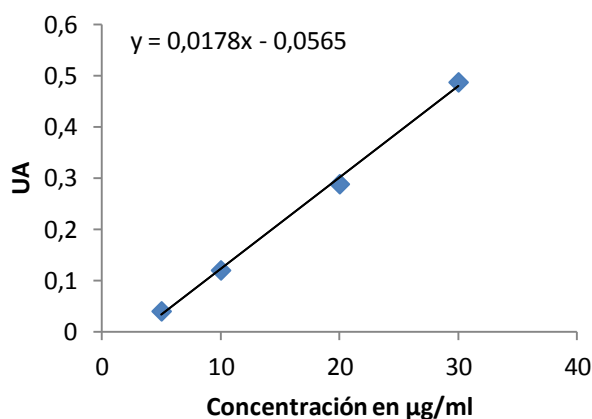


Figura 2. **Curva de calibración** En la parte superior se muestra la ecuación de la recta.

5.2- Dosificación de lisados intestinales

Mediante el kit BCA PRO (Sigma) se determinó la cantidad total de proteína de cada muestra de lisado intestinal. Se cuantificaron las muestras de intestinos de animales sacrificados a las 3 hs de alimentados y dos muestras de la otra condición, las cuales luego fueron utilizadas para ensayos de ELISA y Western blot. A partir de la ecuación de la recta se calcularon los valores de concentración de proteína total, utilizando los valores de unidades de absorbancia de la lectura de la placa, que estuvieran dentro

del rango de valores de la curva. Se muestran a continuación la concentración de proteína de los extractos intestinales.

Muestra 1 (sacrificados a las 3 horas de alimentado): 89,91 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Muestra 2 (“ “ “ “ “ “ “): 93,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Muestra 3 (“ “ “ “ “ “ “): 98,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Muestra 4 (sacrificado a las 96 horas de alimentado): 52,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Muestra 5 (“ “ “ “ “ “ “): 51,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

5.3- Puesta a punto de ELISA

El primer paso para la puesta a punto de este método que nos permitiría cuantificar la proteína FABP1b contenida en los extractos intestinales, fue determinar el factor de dilución del anticuerpo anti-FABP1b y la cantidad de proteína que emplearíamos como referencia (FABP1b) en nuestra curva de calibración. Para ello se sensibilizó la placa de Elisa con distintas cantidades de proteína pura, y se utilizaron distintas diluciones del anticuerpo primario. Con los datos obtenidos, luego de la lectura a 562nm, se seleccionaron los valores de unidades de absorbancia más adecuados para ensayos posteriores de ELISA. (Tabla 1). Se eligió el factor de dilución que permitía visualizar una un cambio en los valores de UA en relación a la cantidad de proteína sembrada; y se eligió un rango de concentración de proteína que tuvieran valores de UA mayores al blanco de lectura.

	2,50↓	1,25↓	0,625↓	0,312↓	0,156↓	0,078↓	0,039↓	0,019↓	0,0097↓	0,0048↓
1/125→	0,243	0,238	0,238	0,236	0,238	0,237	0,231	0,225	0,223	0,197
1/250→	0,246	0,225	0,226	0,223	0,223	0,223	0,222	0,206	0,204	0,191
1/500→	0,203	0,179	0,188	0,183	0,177	0,177	0,170	0,163	0,155	0,151
1/1000→	0,150	0,148	0,142	0,140	0,139	0,138	0,138	0,133	0,123	0,117
1/2000→	0,122	0,120	0,119	0,116	0,114	0,114	0,110	0,104	0,095	0,099
Sin anticuerpo→	0,055	0,057	0,055	0,058	0,061	0,061	0,058	0,056	0,058	0,067

Tabla 1. Puesta a punto de Elisa. En la tabla se indican los factores de dilución del anticuerpo empleado y los valores de absorbancia obtenidos con las distintas cantidades de FABP1b en cada dilución de anticuerpo ensayada. En la primer columna: factor de dilución de anticuerpo primario. En la primer fila: cantidad de proteína pura FABP1b en µg. Columnas 2-10 unidades de absorbancia obtenidas.

5.4- ELISA no competitivo

Mediante el protocolo mencionado en materiales y métodos, se realizó un ELISA no competitivo (donde los valores de absorbancia son proporcionales a la cantidad de proteína fijada en la placa). En primer lugar se obtuvo una curva de calibración con los datos de unidades de absorbancia de los pocillos con distintas cantidades de proteína FABP1b pura fijada (Figura 3).

En el caso de los lisados intestinales, se sensibilizaron dos pocillos con 10 µl de lisado para cada condición alimenticia. Tanto las muestras correspondientes a peces sacrificados a las 3 horas de alimentados como las correspondientes a peces sacrificados a las 96 horas, mostraron valores de absorbancia similares a los valores del blanco de lectura (datos no mostrados).

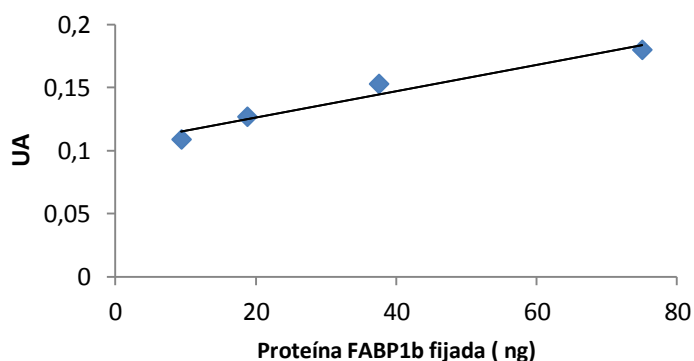


Figura 3. Curva de calibración de ELISA.

En un segundo ensayo de ELISA igual al anterior, donde la cantidad de proteína FABP1b pura fijada fue la misma, se sensibilizó la placa, por duplicado, con 100µl de una muestra de lisado intestinal de la condición sacrificado a las 96 horas de alimentado. La curva de calibración obtenida fue similar a la anterior, y los valores de absorbancia para el lisado fueron similares al blanco de lectura (datos no mostrados).

5.5- ELISA competitivo

Dado que el ensayo anterior no permitió determinar la concentración de la proteína FABP1b contenida en los lisados intestinales, se buscó un método que permitiera aumentar la sensibilidad, como el ELISA competitivo. Los valores de absorbancia que se obtienen son proporcionales a la cantidad de anticuerpo que se une a la proteína pura fijada a la placa, de la mezcla anticuerpo primario-proteína competitiva. Cuanto mayor es la señal colorimétrica, menor es la competencia, y por lo tanto menos cantidad de proteína FABP1b está presente en la mezcla anticuerpo primario-proteína.

Se realizó una curva de calibración mediante el procedimiento citado en materiales y métodos. Ésta curva es logarítmica, y con la ecuación de la curva se determinó la cantidad de proteína FABP1b de cada lisado (Figura 4).

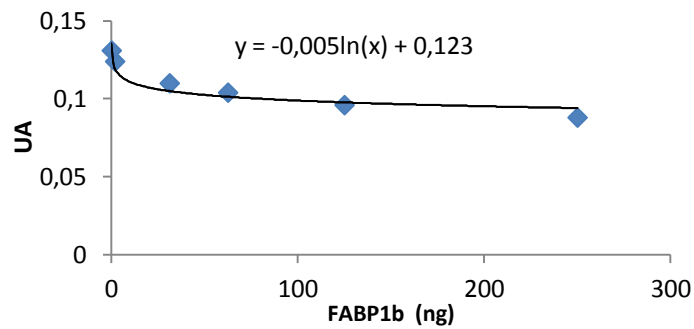


Figura 4. Curva de calibración de ELISA competitivo. En la parte superior se muestra la ecuación de la curva.

La competencia se realizó con dos muestras de lisado de la condición sacrificados a las 3 horas de alimentados (Tabla 2).

La muestra 1 contenía 89,91µg de proteína total por µl de lisado, entonces 0,735µg corresponde al 0,82%. La muestra 2 contenía 93,8µg de proteínas totales por µl de lisado, y vimos que los 1,1µg de FABP1b correspondían al 1,2% de las proteínas totales.

Tabla 2. ELISA competitivo, Se muestran resultados del ensayo donde el competidor correspondía a la mezcla de anticuerpo anti-FABP1b con 30µl de lisado intestinal.

FABP1b-lisado	FABP1b (µg)	Concentración (µg/µl)
muestra 1	0,735µg	2,45E-02
muestra 2	1,1µg	3,66E-02

5.6- Western blot

Este método permite también determinar la cantidad de proteína contenida en una muestra siempre y cuando empleemos un estándar de concentración conocida, y un estándar interno que asegura que la cantidad de proteína sembrada es idéntica en todos los casos a comparar. Lamentablemente no se contaba con un anticuerpo contra otra proteína presente en el intestino de estos peces para normalizar los resultados. Por otro lado, el estándar de concentración conocida elegido fue la proteína FABP1b pura. A pesar de repetidos ensayos no se logró obtener señales que sirvieran para

este fin. De todos modos este método podría ser útil para comparar la intensidad de la señal de dos cantidades de proteína idénticas de lisados de cada condición.

Así, una vez completada la reacción, la imagen muestra la señal obtenida luego de 5 minutos de exposición para 200 μg y 400 μg de cada lisado (Figura 5). La intensidad observada correspondiente al pez luego de 3hs de alimentado es ostensiblemente mayor que la del pez que se mantuvo sin alimentarse por 96 horas.

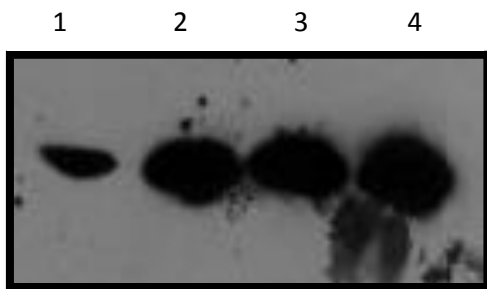


Figura 5. Western blot. Carril 1 y 2: 200 μg de lisado intestinal de peces en inanición y alimentados respectivamente. Carril 3 y 4: 400 μg de de lisados intestinales de peces en inanición y alimentados respectivamente.

Utilizando el programa Image J, se compararon los valores de intensidad entre las muestras (Figura 6). Las muestras correspondientes a los carriles 3 y 4 de la figura 5 no fueron analizadas por su grado de saturación.

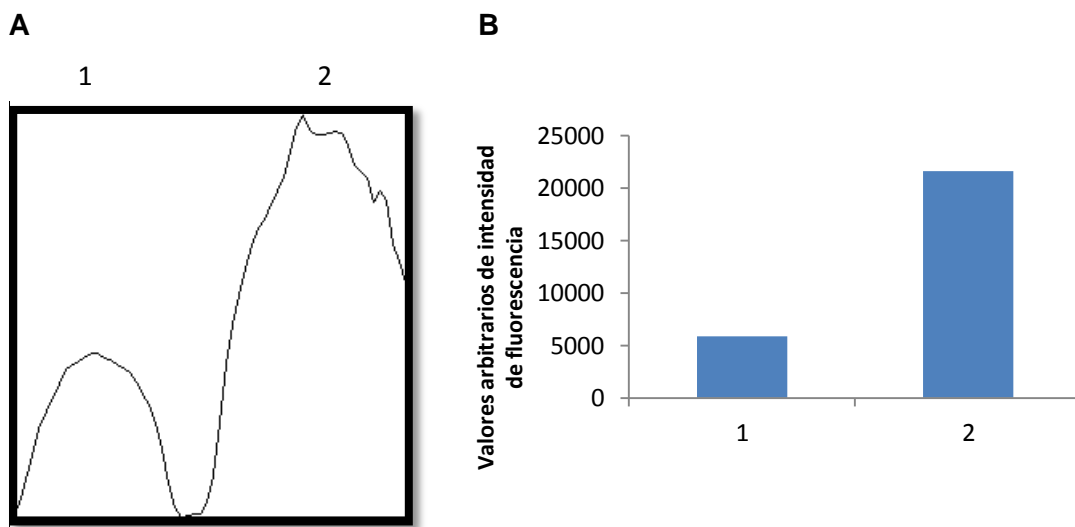


Figura 6. Western blot: densitometría. A) gráfica de intensidad de señal. B) gráfico de barras representando los picos de intensidad de señal. 1 lisado intestinal de peces en inanición, 2 lisados intestinales de peces alimentados.

De este análisis surge que la muestra 1, correspondiente a lisados intestinales de peces en inanición, tenía 3,6 veces menos intensidad de señal, que la muestra 2, correspondiente a lisados intestinales de peces alimentados.

6-DISCUSIÓN

Para cualquier estudio de interacciones bioquímicas, es clave poder determinar de manera precisa la concentración proteica. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV; para la formación de derivados químicos; o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes [28].

Nuestra primera cuantificación de la proteína que emplearíamos como referencia en el resto del trabajo fue realizada a través de lectura por espectrofotometría teniendo en cuenta el coeficiente de extinción teórico de la proteína. Obtuvimos un valor de concentración (2,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) el que nos propusimos corroborar mediante otro método de cuantificación. A través del empleo de la densitometría a partir de electroforetograma, pudimos tener un segundo valor de la concentración de la proteína FABP1b pura, la cual fue de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El tercer método de cuantificación de la proteína FABP1b fue el del método del ácido bicincónico utilizando el Kit BCA PRO, con el cual obtuvimos un valor de concentración de 1,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Si comparamos los resultados de los tres métodos, dos de ellos son relativamente concordantes (mediante densitometría y ácido bicincónico), y el resultado obtenido por espectrofotometría fue distinto (una concentración de entre 2 y 3 veces más aproximadamente). Esta diferencia pudo haberse dado por un error en el aparato de lectura, ya que la solución proteica era una solución relativamente pura y no turbia, los cuales son factores que podrían alterar el resultado. Por otro lado, con el método por densitometría obtuvimos un resultado que pudo haberse afectado por el grado de saturación de tinción la banda. Optamos por el valor que nos proporcionó el método del ácido bicincónico, y además lo elegimos para aplicarlo en el resto de los ensayos dado el tipo de muestra a emplear (mezcla de proteínas intestinales). Este método permitió cuantificar tanto muestras proteicas puras o mezclas de proteínas, ya que se

basa en una reacción química donde la intensidad de color generado es proporcional a la cantidad de proteínas presente en la muestra.

Nuestro objetivo fue analizar si la condición alimentaria de estos peces en cultivo modifica la expresión de la proteína FABP1b. Los peces fueron alimentados y sacrificados a las 3 y 96 horas, disecando la región anterior del intestino. Para cuantificar la proteína FABP1b contenida en los extractos intestinales obtenidos en las dos situaciones, empleamos dos métodos: ELISA y western blot. Ambos métodos son específicos ya que se emplean anticuerpos específicos contra la proteína de interés, y con ellos se logran obtener resultados complementarios.

En el ELISA no competitivo, esperabamos obtener una señal que representara la cantidad de proteína FABP1b.1 presente en los lisados intestinales. Los valores de absorbancia obtenidos para los lisados fueron similares al blanco de lectura. Consideramos que quizá la cantidad de proteína empleada para sensibilizar la placa era insuficiente. Presumiendo que la proteína FABP1b estaría representando un bajo porcentaje de proteínas totales del lisado. Se procedió a aumentar 10 veces la cantidad de proteína fijada a la placa, y aún así los valores en unidades de absorbancia no se diferencian del blanco.

Tomando en cuenta estos datos, concluimos que esta técnica no era eficiente para detectar una proteína específica dentro de un lisado probablemente por la competencia con las otras macromoléculas del lisado que se estarían fijando a la placa.

En consecuencia, decidimos utilizar como alternativa un ELISA competitivo, en el cual solo se fija a la placa la proteína pura FABP1b y luego se le agrega el anticuerpo específico junto al lisado. De este modo el antígeno presente en el lisado compite con la proteína fijada, por el anticuerpo. Se esperaba que la técnica de este modo aumente la sensibilidad.

En estas condiciones se detectó señal colorimétrica para los lisados. Determinamos así que la proteína FABP1b representa porcentajes bajos del total de proteínas del lisado (0,82 y 1,2%) en la condición ensayada (3hs después de alimentados). Esto concuerda con datos bibliográficos [18], que estiman entre un 2 y 5% del contenido de proteínas solubles, y por lo tanto la técnica fue suficientemente sensible para detectar las cantidades de proteína FABP1b. Mediante esta técnica determinamos que la concentración de FABP1b para cada muestra evaluada.

Aunque no contábamos con suficiente material para determinar la cantidad de proteína en la otra condición, fuimos capaces de poner a punto un método que permite cuantificar la proteína FABP1b. Para trabajos próximos se tendría que repetir el ELISA competitivo, donde se cuantifique la cantidad de FABP1b en lisados de ambas condición alimenticias, para poder comparar ambas condiciones con este método, cumpliendo con el objetivo central del trabajo.

La técnica de western blot permitió comparar la proteína expresada en las dos situaciones alimentarias, si bien no pudimos determinar valores de concentración. Determinamos que la condición en inanición tenía 3,6 veces menos de proteína FABP1b, que la condición de alimentados. Este resultado indica que la proteína varía sus niveles de expresión en respuesta a la disponibilidad de alimento, sugiriendo un rol activo en la absorción y/o transporte de los lípidos dentro del enterocito. Además, así como en trabajos ya publicados, indica una importancia de la proteína L-FABP en el metabolismo de lípidos. Se ha demostrado que si el gen de la L-FABP no está presente (en ratones knock out) los ácidos grasos son redirigidos al tejido adiposo induciendo obesidad [18].

De todas maneras, al igual que el ELISA competitivo, en trabajos futuros esta técnica debería repetirse con más cantidad de muestras para corroborar los resultados. Se debería emplear un estándar interno, es decir una proteína que no se vea modificada

en respuesta al alimento como de referencia, así como ajustar las condiciones para emplear también la proteína pura como referencia para poder así cuantificarla en lisado. Sería interesante además, agregar otras condiciones alimenticias para ser evaluadas.

7-CONCLUSIONES

Se determinó la cantidad relativa de la proteína FABP1b, en muestras de lisados intestinales de peces alimentados, con la técnica de ELISA competitivo. El porcentaje que representa la FABP1b en el total de proteínas es bajo, con valores cercanos al 1%, concordantes con lo reportado en la bibliografía para otros vertebrados.

Mediante western blot se verificó una diferencia cuantitativa entre ambas condiciones alimenticias. Efectivamente existe una relación directa entre cantidad de alimento disponible y expresión de la proteína FABP1b en el intestino anterior de *Danio rerio*.

Con respecto a los métodos de cuantificación evaluados, concluimos que para cuantificar una muestra, se deben evaluar más de un método para determinar cuál es el más adecuado para la muestra a analizar.

8-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Perez Llamas, F.; Zamora Navarro, S. (2002) Introducción, definiciones y conceptos básicos. En: Perez Llamas F.; Zamora Navarro, S. *Nutrición y alimentación humana*. España, Aula de Mayores, Universidad de Mursia, pag. 16.
- [2] Navarro Santamaría, V.; Portillo Baquedano, M. (2008) Digestión y absorción de lípidos. En: Rodríguez Rivera, V. M.; Simón Magro, E.; Paz Otero, P. *Bases de la alimentación humana*. España, Netbiblo, S.L., pag. 315.
- [3] Arasa Gil, M. (2005) Lípidos o Grasas. En: Arasa Gil, M.; Carretero, D. *Manual de nutrición deportiva*. España, Paidotribu, pag. 35.
- [4] Hussaina, M. M.; Fatma, S.; Pana, X.; Iqbal, J. (2005) Intestinal lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology*. 16, 281-285.
- [5] Ahnen, D. J. (1992) Asimilación de nutrientes. En: Kelley, W. N. *Medicina interna*. Argentina, Médica Panamericana, pag. 439-440.
- [6] Hill, R. W.; Wyse, G. A.; Anderson, A. (2006) Nutrición, alimentación y digestión. En: Hill, R. W.; Wyse, G. A.; Anderson, A. *Fisiología animal*. España, Médica Panamericana, pag. 135.
- [7] Niot, I.; Poirier, H.; Trang Tran, T. T.; Besnard, P. (2009) Intestinal absorption of long-chain fatty acids: Evidence and uncertainties. *Progress in Lipid Research*. **48**, 101–115.
- [8] Ho, S. I.; Lorent, K.; Pack, M.; Farber, S. A. (2006) Zebrafish fat-free is required for intestinal lipid absorption and Golgi apparatus structure. *Cell Metab*. **3** 289-300.
- [9] Rebecca L., Smathers and Dennis R., Petersen (2011) The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions, *Human Genomics*. **5** (3), 170-191.

- [10] Levin, L. B.; Nachliel, E.; Gutman, M.; Tsfadia, Y. (2009) Molecular dynamics study of the interaction between fatty acid binding proteins with palmitate mini-micelles. *Mol Cell Biochem.* **326**, 29-33.
- [11] Hertzfel, A. V., Bernhor, D. A. (2000) The mammalian fatty acid binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function, *Trends in endocrinology and metabolism.* **11**, 175-180.
- [12] Estéves, A., Erlich, R.(2006) Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Biochemistry and Physiology C. Toxicological pharmacology.* **142**, 3-4.
- [13] Alves-Costa, F. A.; Denovan-Wright, E. M.; Thisse, C.; Thisse, B.; Wright, J. M. (2008) Spatio-temporal distribution of fatty acid-binding protein 6 (fabp6) gene transcripts in the developing and adult zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Journal.* **275**, 3325–3334.
- [14] Wang, M.; Liu, Y. E.; Goldberg, I. D.; Shi, Y. E. (2003) Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid binding protein MRG. *Journal of Biological Chemistry.* **278**, 47319-47325.
- [15] Duttaroy, A. K. (2003) Fatty acid binding proteins and fatty acid transport. En: Duttaroy, A. K.; Spencer, F. *Cellular proteins and their fatty acids in health and disease.* Alemania, Wiley-VCH, 121.
- [16] Newberry, E. P.; Kennedy, S. M.; Xie, Y.; Luo, J.; Davidson, N. O. (2009) Diet-induced alterations in intestinal and extrahepatic lipid metabolism in liver fatty acid binding protein knockout mice. *Mol Cell Biochem.* **326**, 1-2.
- [17] Abumrad, N.; Storch, J. (2006) Rol of membrane and cytosolic fatty acid binding proteins in lipid processing by the small intestine. En: Barret, K. E.; Ghishan, F. K.; Merchant, J. L.; Said, H. M.; Wood, J. D.; Johnson, L. R. ed. *Physiology of the gastrointestinal tract.* USA, Elsevier, 1701.
- [18] Atshaves, B. P.; Martin, G. G.;Hostetler, H. A.; McIntosh, A. L.; Kierb, A. B.; Schroeder, F. (2010) Liver fatty acid-binding protein and obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **21**, 1015-1032.

- [19] McIntosh, A. L.; Atshaves, B. P.; Hostetler, H. A.; Huang, H.; Davis, J.; Lyuksyutova, O. I.; Landrock, D.; Kier, A. B.; Schroeder, F. (2009) Liver type fatty acid binding protein (L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor- α activity in cultured primary hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **485**, 160-173.
- [20] Neeli, I.; Siddiqi, S. A.; Siddiqi, S.; Lagako, W. S.; Binas, B.; Gheyi, T.; Storch, J.; Mansbach, C. M. (2007) Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *The journal of biological Chemistry*. **282**, 17974-17984.
- [21]. Brand, M.; Granato, M.; Nusslein-Volhard, C. (2002) Keeping and raising zebrafish. En: Nusslein-Volhard, C.; Dahm, R. *Zebrafish: A practical approach*. USA, Oxford University Press, pag. 5.
- [22] Detrich, H. W.; Westerfield, M.; Zon, L. I. (1999) Introduction. En: Detrich, H. W.; Westerfield, M.; Zon, L. I. *Methods in cell biology*. USA, Academic Press, **59**, 5.
- [23] Agulleiro, M.; André, M.; Morais, S.; Cerdà, J., Babin, P. J. (2007). High transcript level of fatty acid-binding protein 11 but not of vitellogenin receptor during ovarian follicle atresia of a teleost fish (*Solea senegalensis*). *Biology of Reproduction* **77**, 504-517.
- [24] André, M.; Ando, S.; Ballagny, C.; Durliat, M.; Poupard, G.; Briançon, C.; Babin, P. J. (2000) Expression of intestinal fatty acid binding protein gene reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 249-252.
- [25] Karanth, S.; Lall, S. P.; Denovan-Wright, E. M.; Wright, J. M. (2009) Differential transcriptional modulation of duplicated fatty acid-binding protein genes by dietary fatty acids in zebrafish (*Danio rerio*): evidence for subfunctionalization or neofunctionalization of duplicated genes. *BMC Evolutionary Biology*. **9**, 219.

[26] Canclini, L. Generación de herramientas moleculares para el estudio de las proteínas de unión a ácidos grasos (FAPBs) del enterocito de *Danio rerio*. Tesis de Maestría Pedeciba, 2010.

[27] Postlethwait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A. and Talbot, W.S. **(2000)** Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes, *Genome research* **10** 1890-1902.

[28] Segal, C. (2005) Manual de prácticas de biología molecular de la célula. Editorial publidisia.