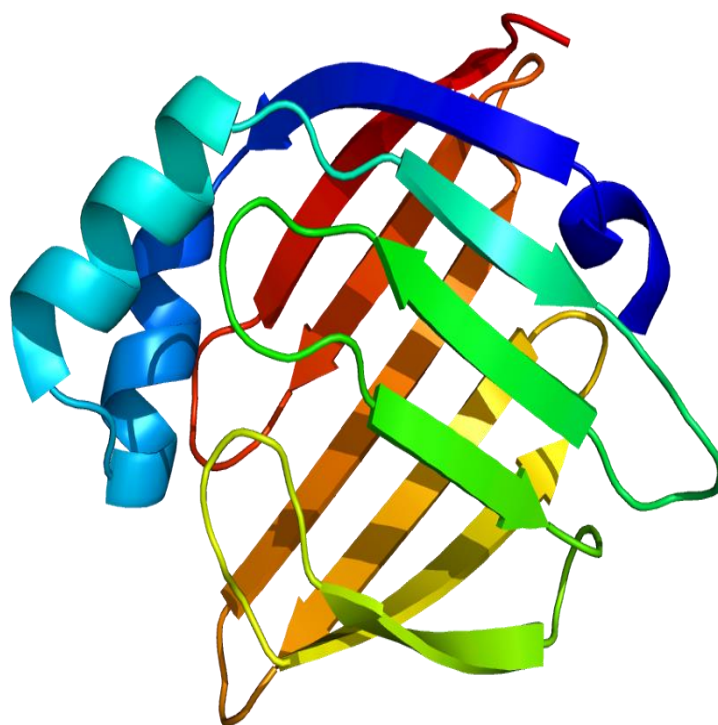


PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PROTEÍNA FABP2 DE *DANIO RERIO*



FEDERICO MARTÍNEZ WALLACE

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORA:

Dra. ADRIANA ESTEVES

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias
Montevideo, Marzo 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano, por todo, no estaría acá si no fuera por ustedes, en un montón de sentidos.

A mi tutora, Adriana Esteves. No me imagino una tutora mejor, sinceramente. El universo me premió en colocarla en mi camino.

A todo el equipo del Piso 3, ala Norte, y a mis compañeros del Lab 304, especialmente a Ceci, Vale, Gaby y Bruno por estar siempre disponibles para evacuar dudas, ayudarme, compartir conocimiento y darme ánimo.

A todos en general por su paciencia, y por confiar en mí y empujarme a seguir, incluso cuando yo mismo dudé más de una vez de mí mismo, siempre estuvieron con buen ánimo alentándome y dándome impulso para seguir.

A Tienda Inglesa Casa Central, por brindarme horarios para poder seguir estudiando y poder así realizar simultáneamente ambas actividades. No me olvido de esos momentos cuando salía apurado de las clases de la facultad y me iba corriendo al trabajo para no llegar tarde. Momentos de sacrificio, pero que hoy valieron la pena, hoy los recuerdo con gran alegría.

Por último agradecer también a mis amigos por compartir momentos de risas y también de conocimiento.

“La gota horada la roca, no por su fuerza sino por su constancia “

-Ovidio

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. GENERALIDADES DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS	3
1.2. FABP2	5
1.3. <i>D.RERIO</i> COMO ORGANISMO MODELO	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. OBJETIVO GENERAL	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. EXPRESIÓN DE PET5A-FABP2	9
3.2. PURIFICACIÓN DE FABP2 POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	10
3.3. CUANTIFICACIÓN DE FABP2 Y ANÁLISIS DEL GRADO DE PURIFICACIÓN .	11
3.4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE FABP2	11
3.5. INMUNOLocalIZACIÓN DE FABP2 EN EL ENTEROCITO DE <i>D.RERIO</i>	12
4. RESULTADOS	13
4.1. EXPRESIÓN DE PET5A-FABP2	13
4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN PURIFICADA	18
4.3. MODELADO POR HOMOLOGÍA	21
4.4. INMUNOHISTOQUÍMICA	27
5. DISCUSIÓN	29
5.1. PERSPECTIVAS	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS

Las primeras proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) fueron identificadas en 1972 por Ockner y colaboradores a partir del purificado de la mucosa intestinal (Ockner et al., 1972). Desde el primer aislamiento se han identificado al menos nueve tipos distintos de proteínas de esta familia en los vertebrados (Glatz y Van der Vusse et al, 1997; Xu et al., 2019). Esta familia de proteínas, junto con la familia de las lipocalinas y las avidinas, forman parte de la superfamilia de las Calicinas (Flower et al., 2000; Chiu et al., 2010).

Las FABPs son proteínas de bajo peso molecular (14-15 kDa) que unen en forma no covalente ligandos hidrofóbicos, principalmente ácidos grasos. Conforman una familia multigénica con una distribución filogenética muy amplia (Hertzel y Bernlhor, 2000; Esteves y Ehrlich, 2006; Smathers *et al.*, 2011; Storch and Thumser, 2010; Venkatachalam *et al.*, 2017). Se expresan en gran abundancia en tejidos involucrados en el metabolismo activo de lípidos, tales como hígado, intestino, corazón y adipocitos (Hertzel y Bernlhor, 2000). Son nombradas de acuerdo al tejido en el que fueron identificadas por primera vez; por ejemplo, FABP hepática (L-FABP o liver FABP), FABP intestinal (I-FABP o intestinal FABP). Actualmente se tiende a emplear una nomenclatura en la que se le asigna un número a cada una luego de la sigla FABP; por ejemplo FABP1 para la forma hepática y FABP2 para la intestinal (Hertzel y Bernlhor, 2000).

Los miembros de las FABPs muestran una similitud moderada en su estructura primaria, que varía entre el 20% y el 70% (Banaszak et al., 1994; Haunerland and Spener, 2004). Comparten una estructura terciaria general formada por diez cadenas β antiparalelas con dos hélices α cortas (αI y αII), ubicadas entre la primera (βA) y la segunda cadena β (βB), formando un barril β que encierra una cavidad donde se aloja

el ligando, accesible al solvente (Jones et al., 1988) (figura 1). La cavidad se ubica en el extremo del barril cerca del motivo hélice-vuelta-hélice, que se cree que forma parte de un portal para la entrada y salida del ligando (Banaszak et al., 1994; Bernlohr et al., 1997). Esta región portal que consta de la hélice α II y los bucles β C- β D y β E- β F; se ha identificado como un determinante clave de los sutiles cambios conformacionales relacionados con la unión del ligando (Friedman et al., 2006; Ragona et al., 2014). Distintas evidencias han sugerido que el residuo Phe57 altamente conservado, jugaría un papel importante en la región portal (Simpson y Bernlohr, 1998; Lücke et al., 2001; Gillilan et al., 2007).

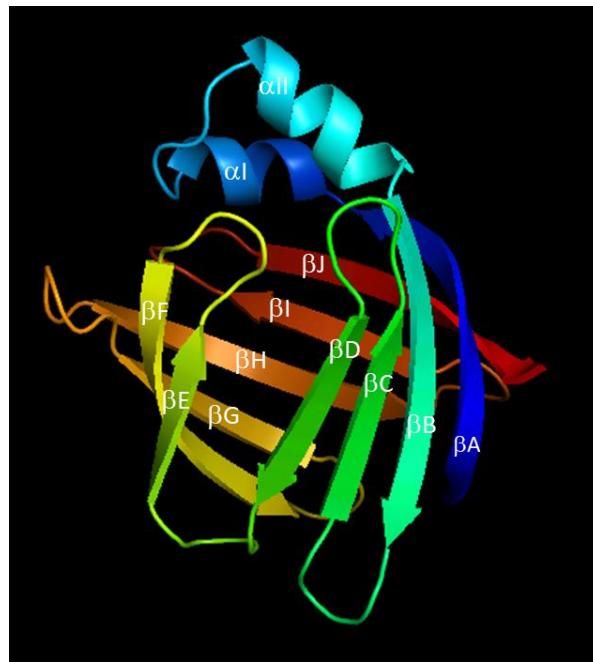


Figura 1: Estructura de FABP2 de rata(1lfc.pdb)

En términos generales la función de estas proteínas estuvo vinculada al transporte de ácidos grasos hacia los distintos organelos de acuerdo a las necesidades de cada tejido (Gordon y Lowe, 1985). Estudios posteriores indicaron que se distinguen unas de otras, no sólo por su distribución tisular, sino también por la especificidad y afinidad por sus ligandos sugiriendo funciones específicas. Algunos de sus miembros estarían implicados en la modulación del crecimiento y proliferación celular, en la provisión de energía metabólica, así como en la regulación de la expresión génica e inmunidad

celular (Glatz y Veerkamp, 1985; Madsen et al., 1992; Yang Y, et al., 1994; Shimizu et al., 1997; Wang et al., 2003). Hallazgos recientes indican que las FABPs no sólo son importantes en sus tejidos de origen, sino que también pueden influir en el metabolismo y en funciones de tejidos distales a sus sitios de expresión (Xu et al., 2019).

1.2. FABP2

En la región del intestino donde tiene lugar la absorción de los lípidos, se expresan en forma abundante dos miembros de esta familia de proteínas, FABP1 y FABP2 (Bass, 1988, Alpers et al., 2000). Ambas proteínas son las únicas de esta familia con co-expresión elevada en un mismo tejido. La presencia de estas dos proteínas en el intestino ha llevado a la especulación de que podrían asumir roles únicos en el metabolismo de los ácidos grasos intestinales (Levy et al., 2009; Lai et al., 2020). Se ha propuesto que las mismas participan en el transporte intracelular de los ácidos grasos de cadena larga absorbidos, dirigiéndolos hacia los distintos compartimentos subcelulares, incluyendo el núcleo (Storch y Córscico, 2008; Montoudis et al., 2008; Lagakos et al., 2011; Esteves et al., 2016). FABP2 estaría vinculada con la β -oxidación en la mitocondria y la captura de colesterol regulando genes involucrados en dichos procesos (Montoudis et al., 2008). También se ha sugerido que FABP2 estaría involucrada en procesos asociados a la proliferación celular (Besnard et al., 2002; Storch y McDermont, 2008).

Estudios con ratones *fabp2* $-/-$ y la mutación humana Ala54Thr sugieren que esta proteína podría funcionar fisiológicamente como un componente sensible a los lípidos en la homeostasis energética, y no exclusivamente en el transporte de ácidos grasos de la dieta (Baier et al., 1995; Vassileva et al., 2000; Stan et al., 2005). La FABP2 podría aportar información sobre el estado de los lípidos de la dieta en mecanismos que controlan universalmente la utilización de la energía, el almacenamiento de energía y eventualmente el peso corporal (Vassileva et al., 2000). Otro estudio, también en ratones que carecen de FABP2 muestra una disminución de la longitud de las vellosidades intestinales, así como una alteración en la densidad de células caliciformes

y un aumento de la permeabilidad intestinal (Xu et al., 2019). Estudios recientes en *Danio rerio fabp2* ^{-/-} sugieren que esta proteína podría regular el metabolismo de los triacilglicéridos y el colesterol y promover la absorción de ácidos grasos omega 3 (Zhao et al., 2020).

Otro aspecto vinculado a estas proteínas es su uso como biomarcador. Estudios recientes indican que los niveles circulantes de las FABPs en el suero, pueden ser utilizados para detectar enfermedades metabólicas e inflamatorias, así como la detección de tipos específicos de cáncer. Se ha observado que FABP2 se libera rápidamente en la circulación sistémica tras una lesión en los enterocitos, y en consecuencia se ha demostrado que es un biomarcador útil para el diagnóstico de isquemia intestinal aguda, incluida la enterocolitis necrotizante y la isquemia mesentérica no oclusiva. También se ha sugerido como un marcador de diagnóstico para la detección en pacientes con insuficiencia renal (Tsai et al., 2020).

En cuanto a FABP2 de mamíferos, al igual que la mayoría de los miembros de su familia, tiene un único sitio de unión a ligando, y posee alta afinidad por los ácidos grasos saturados e insaturados. Participa en la transferencia de ácidos grasos desde y hacia las membranas mediante un mecanismo colisional (Hsu et Storch, 1996). Particularmente, la región hélice vuelta-hélice de la proteína contiene varios residuos cargados positivamente que interactúan con las cargas negativas de fosfolípidos de las membranas (Franchini et al., 2008).

En lo referente a la regulación de la expresión del gen correspondiente, la información es más escasa. Se ha demostrado un aumento en los transcritos de *fabp2* en presencia de la hormona intestinal PYY (péptido tirosina tirosina), que es secretado por las células endócrinas ileales cuando los lípidos de la dieta alcanzan la parte distal del intestino delgado (Halldén et Aponte, 1997). Datos más recientes mostraron, en el pez cebra, un aumento en la expresión de *fabp2* en respuesta a la ingesta (Esteves et al., 2016; Suárez, 2018).

1.3. *DANIO RERIO* COMO ORGANISMO MODELO

Para la realización del presente trabajo se usó como organismo modelo el pez cebra (*Danio rerio*). El poder contar con un organismo modelo, con genoma secuenciado, de fácil mantenimiento en un entorno de laboratorio, y que además permita estudios *in vivo*, tiene un valor invaluable particularmente para estudios metabólicos (Santoro *et al.*, 2014). Indudablemente, los estudios *in vitro* son también una valiosa contribución y complementan los anteriores. Además, es un organismo que ofrece una combinación única de características como son el tiempo de generación corto, pequeño tamaño y se conoce el genoma.

Por otro lado, la gran similitud estructural entre FABP2 de *D. rerio* y su contraparte humana, un gran cuerpo de evidencia demuestra que el pez cebra puede servir como un "vertebrado canónico" no sólo en biología del desarrollo sino también en el estudio del metabolismo y de enfermedades humanas (Seth *et al.*, 2013, Santoro *et al.*, 2014, Astone *et al.*, 2017; Yoganantharjah *et al.*, 2017; Danilova *et al.*, 2018; Völkel *et al.*, 2018).

Notablemente, el pez cebra muestra a menudo trastornos similares a los de enfermedades humanas, haciendo de este un sistema sobresaliente para estudiar enfermedades hepatobiliares, gastrointestinales y pancreáticas (Zhao *et al.*, 2017). Por ejemplo, muchas de las características de la enfermedad del hígado graso, que en los humanos es típicamente causado por el síndrome metabólico o el abuso de alcohol, así como diabetes tipo II, inflamación intestinal o síndromes raros como el de Alagille, son similares en el pez cebra (DeRossi *et al.*, 2016; Bambino *et al.*, 2018). Son relevantes también los estudios sobre obesidad empleando tanto larvas como adultos, entre los que se incluye un modelo de obesidad (Oka *et al.*, 2010; Faillaci *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Entrenamiento en el uso de técnicas básicas de Bioquímica y Bioinformática, a través de la caracterización de la proteína Fabp2 de *Danio rerio*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Purificación de la proteína recombinante Fabp2 de *D. rerio*.
- 2) Análisis estructural de Fabp2 mediante programas informáticos.
- 3) Inmunolocalización de Fabp2 en el enterocito de *D. rerio* adulto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EXPRESIÓN DE pET5A -FABP2

La región codificante del gen *fabp2* de *D. rerio* fue previamente clonada en el vector de expresión pET5a en la cepa BL21 de *Escherichia coli*. Se partió para este trabajo de un precultivo inoculando 5µl de un stock en glicerol conservado a -80°C, en 3 ml de medio 2xYT conteniendo 100 µg/ml ampicilina. El precultivo se mantuvo durante la noche (ON) a 37°C en agitación. Al día siguiente, se plaqueó en medio sólido (LB-agar, 100 µg/ml ampicilina concentración final) dejando ON a 37°C. La placa resultante se conservó a 4°C como respaldo. A partir del mismo precultivo inicial inoculamos 3µl en 8 tubos de precultivo conteniendo cada uno 3ml de medio 2xYT y 3 µl de ampicilina (100 µg/ml de concentración final), dejando ON a 37 °C en agitación. Posteriormente se inocularon 200 ml de medio de cultivo 2xYT con 6ml de precultivo. Se emplearon 4 matraces con 200 ml c/u dejando en agitación a 200 rpm a 37°C, hasta alcanzar una absorbancia de 0,57, leída a 600nm. Se indujo la expresión del gen con el agregado de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4mM mantenido el cultivo a 37°C en agitación por dos horas. Previo a la inducción se extrajo una alícuota del cultivo para su posterior análisis por electroforesis.

Finalizado ese tiempo, se centrifugó el contenido de cada matraz a 5000xg por 10 minutos a 4°C en centrífuga Beckman J2-21. Una vez centrifugado se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 50 ml de Tris-HCL 30mM pH 8,3 y se centrifugó a 4420xg, a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer de lisis (Tris-HCl 30mM pH8.3, DTT 1mM, EDTA 1mM, NaCl 500mM, PMSF 1mM, MgCL₂ 5mM) en una relación de 1ml de buffer/ 0.1 gramo de bacterias.

Las células fueron sonicadas (sonicador Benchmark modelo DP0150), a una frecuencia de 2 pulsos/segundo durante 30 minutos. Luego de verificar la lisis celular por disminución de absorbancia a 600nm, se centrifugó a 12000xg a 4°C, en centrífuga Beckman J2-21. Se recuperó el sobrenadante.

Para verificar que hubo efectivamente una inducción de la expresión de *fabp2*, se extrajo una alícuota del sobrenadante y se realizó su posterior análisis mediante

electroforesis desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se comparó con la alícuota sin inducir previamente separada.

3.2. PURIFICACIÓN DE FABP2 POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato de amonio al 30% mantenido en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Luego de transcurrido ese tiempo se centrifugó a 10000 rpm a 20°C durante 15 minutos (centrífuga Beckman modelo J2-21 con rotor JA-20). Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con sulfato de amonio al 50% a TA agitando hasta su disolución. Posteriormente se centrifugó a 15000xg durante 15 minutos a 20°C. El sobrenadante se dializó en Tris-Cl 30mM pH8.3, 150mM NaCl, y finalmente se concentró a 5ml usando polietilenglicol 8000 (Sigma). El concentrado proteico se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Se empleó una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S100HR (rango de fraccionamiento de 100-100.000 Da) con un volumen total 320ml. La columna se equilibró con Tris-Cl 30mM pH8.3, 150mM NaCl. Se empleó un flujo de 2ml/minuto colectando 2ml/tubo hasta alcanzar el volumen total de la columna. Se midió la absorbancia de cada tubo a 280nm.

Partiendo del cromatograma obtenido a partir de las lecturas realizadas, se seleccionaron varias muestras para ser analizadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%, de 0,75mm de espesor, teñidos con Azul Coomassie. En todos los casos se usó un tampón de muestra 4X sometiendo cada mezcla a 100 °C durante 5 minutos. Se empleó marcador de masa molecular Accuruler RGB plus (Invitrogen). Las fracciones con banda proteica del tamaño esperado se seleccionaron y conformaron la fracción final purificada.

Para verificar la presencia de Fabp2 se realizó *Western Blot*. Para ello se realizó una electroforesis en las mismas condiciones ya indicadas, con 15 µl de la fracción

final, para transferir a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) en cuba BioRad, durante 1,5hs a 400mA en tampón de transferencia, se preparó 1,5 litros (4,53 gramos de Tris base+ 21,63 gramos de Glicina + 300 ml etanol). La membrana se dejó ON a 4°C en solución de bloqueo (5% leche descremada Conaprole en polvo, 2% glicina). Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra FABP2 (OTI2C4 Thermo Fisher Scientific) y un anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma). La señal se reveló utilizando NBT-BCIP (Roche).

Tanto por electroforesis como por *Western Blot* se observaron dos bandas de peso molecular muy similar al esperado, por lo que se resolvió analizar ambas bandas por espectrometría de masas (Instituto Pasteur de Montevideo).

3.3. CUANTIFICACIÓN DE FABP2 Y ANÁLISIS DEL GRADO DE PURIFICACIÓN

Para la cuantificación proteica de las fracciones del producto obtenido por cromatografía se utilizó un kit de Thermo Scientific basado en el método del ácido bicinconínico (BCA). En una placa de 96 pocillos se midió la absorbancia a 562 nm de triplicados de la fracción purificada y sus diluciones 1/10, 1/20, 1/50, 1/100. Se tomó como estándar la albúmina sérica bovina (BSA) del kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para analizar el grado de pureza de la proteína, se realizó una SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. Se analizó el gel, mediante el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en Image J2, (Fiji), para determinar el porcentaje de las bandas visibles correspondientes a Fabp2 y estimar con mayor precisión el rendimiento de la purificación.

3.4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE FABP2

Se construyó un modelo por homología de la proteína Fabp2 utilizando las facilidades de Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Se partió de la secuencia aminoacídica de *D. rerio* AAH75970.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El molde elegido fue 1ifc.1.A correspondiente a la proteína FABP2 de rata que presentó 66,67% de similitud de secuencia.

Se empleó el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para comparar la Fabp2 con proteínas de la familia obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.5. INMUNOLocalIZACIÓN DE FABP2 EN EL ENTEROCITO DE *Danio rerio*.

Se analizó la localización de la proteína Fabp2 utilizando muestras de intestino anterior de *D. rerio adulto* conservadas en parafina. Para llevar a cabo el desparafinado de las muestras, se sumergieron las mismas en una solución de Tolueno al 100% durante 10 minutos. Luego se sumergieron en soluciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%, 40%) durante 10 minutos en cada una. Una vez finalizado el desparafinado de las muestras, se hicieron 2 lavados con PBS durante 10 minutos a TA; posteriormente se sumergieron en solución de bloqueo (500 mM de glicina, 0,1% BSA, 0,05% Tween 20) durante 20' a TA. Una vez finalizado el bloqueo, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-FABP2 (OT12C4 Thermo Fisher Scientific), a una dilución de 1/100 durante 120 minutos a 37 °C. Luego de transcurrido ese tiempo, se realizaron nuevamente lavados con PBS; una vez finalizados los lavados se incubaron con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher), junto con DAPI (Thermo Fisher Scientific) durante 60 minutos a TA en ausencia de luz. Se montaron con antifade (Thermo Fisher).

Se utilizó como control negativo la incubación solamente con el anticuerpo secundario.

Las secciones fueron observadas mediante microscopía confocal con la colaboración de la Dra. Lucía Canclini (Dpto. de Genética, IIBCE).

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESIÓN DE PET5A-FABP2

La región codificante del gen *fabp2* de *Danio rerio* fue previamente clonada en el vector de expresión pET5a. Para llevar adelante este trabajo partimos de un stock conservado en glicerol a -80°C que, inoculado en medio 2xYT se cultivó en presencia de IPTG para inducir la expresión del gen. La figura 1 muestra el análisis mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15% de una alícuota del cultivo inducido con IPTG y sin inducir. En el carril 2 se señala una banda intensa de peso molecular aproximado al esperado (15 kDa). Mencionamos, además, que en la muestra sin inducir se observa expresión basal de la proteína (carril 3). Este resultado nos permitió iniciar la purificación de la proteína por cromatografía de exclusión molecular.

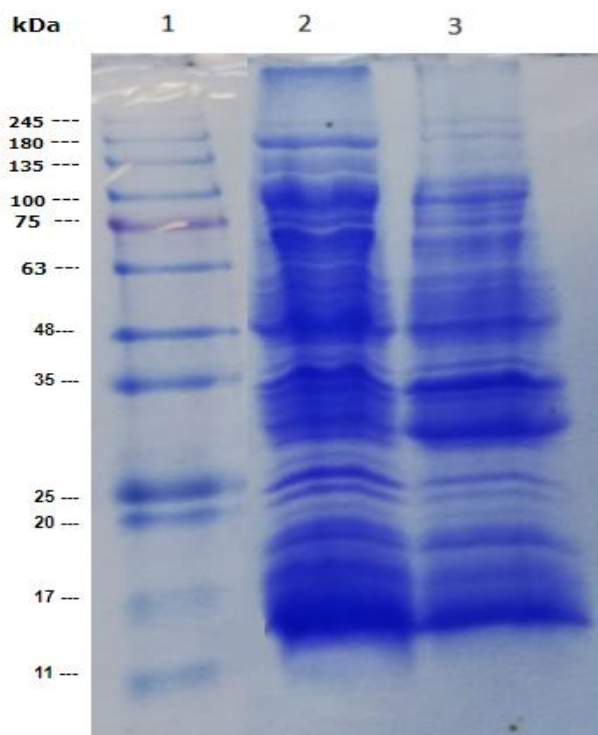


Figura 1. Expresión de Fabp2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15% teñido con Azul Coomassie: Carril 1: Marcador de masa molecular; carril 2: alícuota de cultivo inducido; carril 3: alícuota de cultivo sin inducir. Se usó un volumen de carga de 15 µL

Siendo el resultado anterior el esperado, se pasó a la purificación de la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular precipitando la fracción soluble previamente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (tesis de maestría de Mariana Suárez). Se usó una columna HiPrep Sephacryl S100HR. Se empleó un flujo de 2ml/minuto colectando 2ml/tubo hasta alcanzar el volumen total de la columna de 320 ml. Se midió la absorbancia de cada muestra a 280 nm. El volumen muerto calculado fue de 100 ml. En vista de ello colectamos en forma separada 90ml de volumen muerto (no se muestra en el cromatograma) comenzando la colecta a partir de los 92 ml (tubo 1). El cromatograma obtenido se muestra en la figura 2.

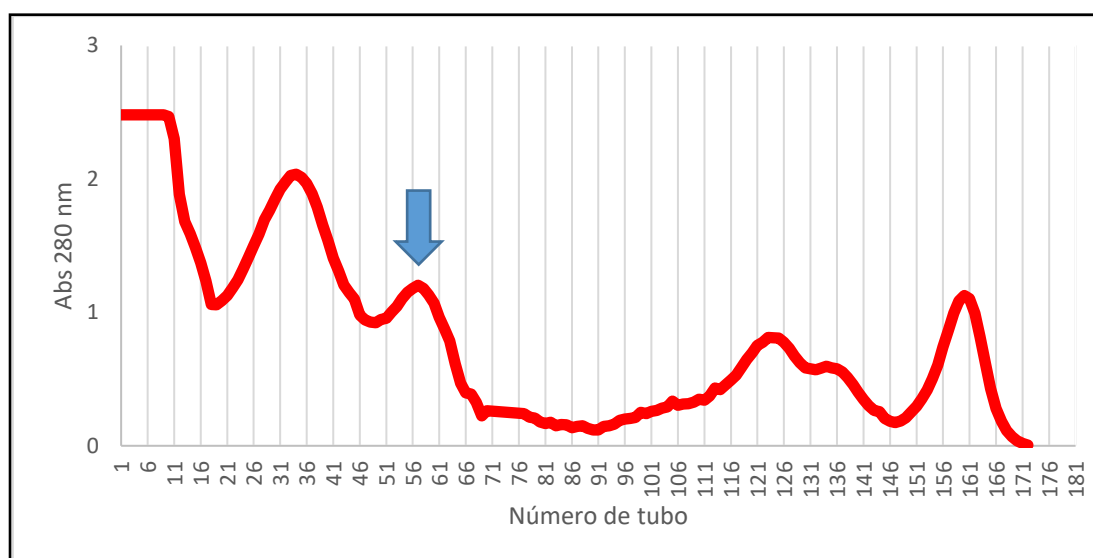


Figura 2: Purificación de Fabp2. La figura muestra el perfil de elución obtenido por cromatografía de exclusión molecular. La flecha indica el pico en el que luego confirmamos la presencia de la proteína.

Se analizó por SDS-PAGE los eluatos seleccionados de cada uno de los picos obtenidos (figura 3A). Como muestra la figura en el carril 5 (tubo 57) se observa dos bandas, una de mayor intensidad que la otra, de peso molecular muy similar (~15kDa), correspondientes al pico indicado con una flecha en la figura 2. Posteriormente, se analizó con mayor detalle los eluatos del pico en el que se encontró presente la proteína estudiada. Como puede observarse en la figura 3B la proteína Fabp2 comienza a visualizarse a partir el tubo 47 (carril 2) hasta el tubo 63 (carril 10). Como puede observarse, la cantidad relativa de las 2 bandas de aproximadamente 15 kDa fue

cambiando. Siendo las fracciones más puras las colectadas entre los tubos 54 hasta el 63, que se juntaron conformando la fracción final.

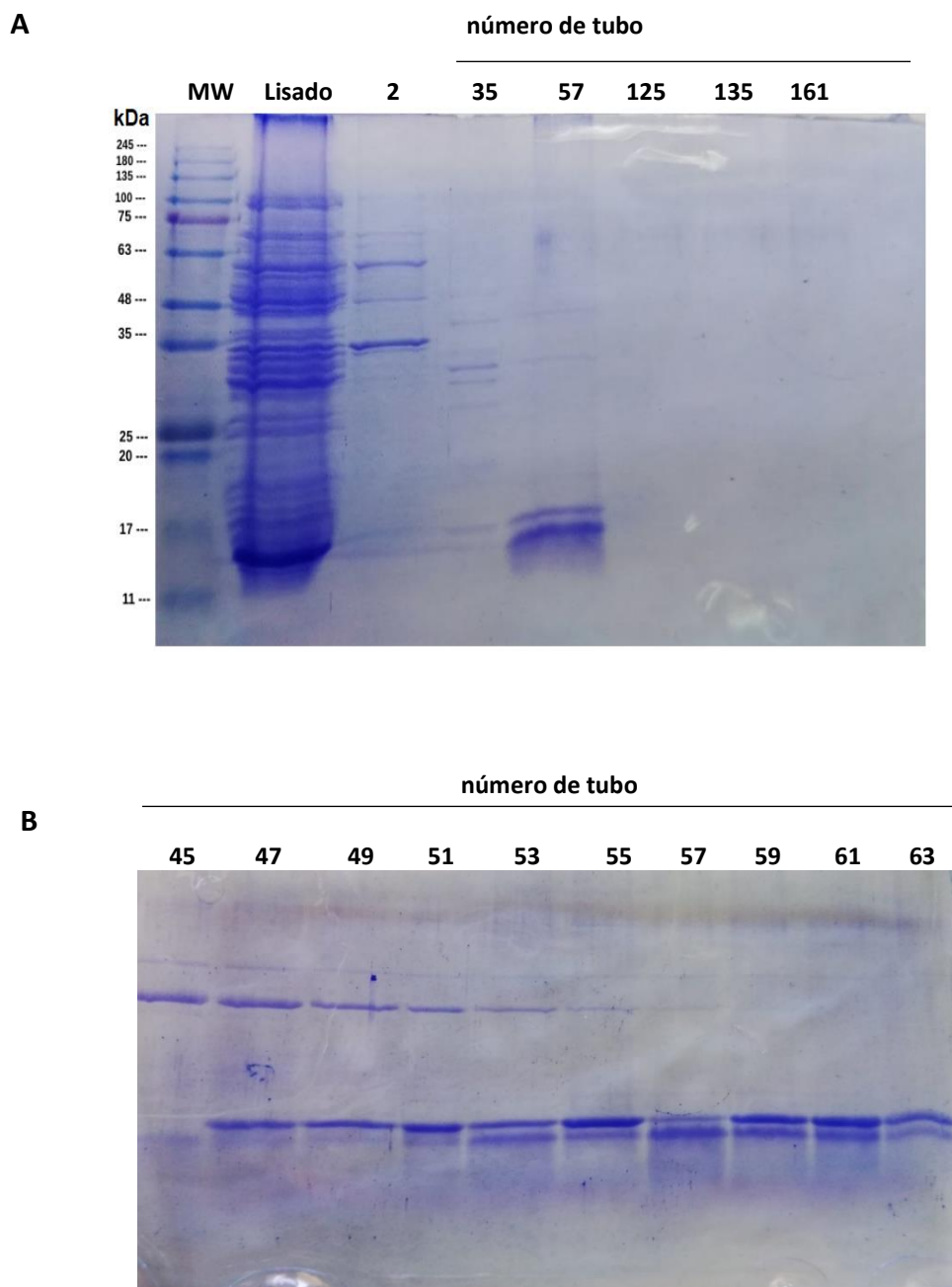


Figura 3: Análisis electroforético de la cromatografía. Electroforesis en poliacrilamida al 15% teñido con Azul Coomassie. A) Carril 1: marcador de masa molecular (5 μ L); carril 2: lisado inducido de pET5A-FABP2 (8 μ L); carril 3: tubo 2; carril 4: tubo 35; carril 5: tubo 57; carril 6: tubo 125; carril 7: tubo 135; carril 8: tubo 161. B) carril 1: tubo 45; carril 2: tubo 47; carril 3: tubo 49; carril 4: tubo 51; carril 5: tubo 53; carril 6: tubo 55; carril 7: tubo 57; carril 8: tubo 59; carril 9: tubo 61; carril 10: tubo 63. Se sembró 12 μ L de cada fracción.

Para determinar cuál de las dos bandas correspondía a Fabp2, se realizó un *Western Blot*. Para ello se tomó una alícuota de la fracción final (tubos 54 al 63) para analizar. Se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón específico contra Fabp2. Como anticuerpo secundario se usó anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (figura 4). Se puede apreciar en la imagen dos bandas de peso molecular muy cercano de 15 kDa aproximadamente, ambas se marcaron con el anticuerpo específico. Si bien hay una banda mayoritaria, la segunda banda nos generó dudas, por lo que decidimos analizar ambas bandas por espectrometría de masas. Las demás bandas de mayor peso molecular observadas podrían ser uniones inespecíficas del anticuerpo.

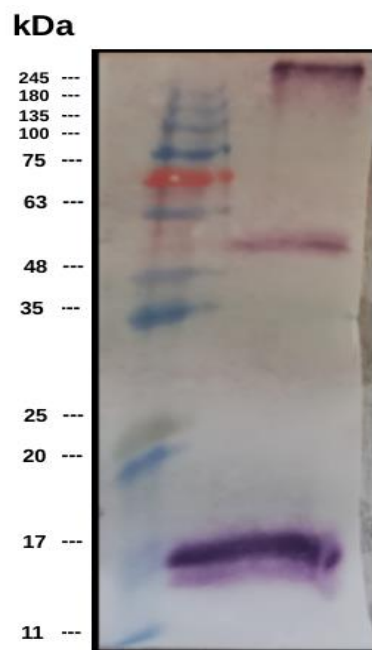
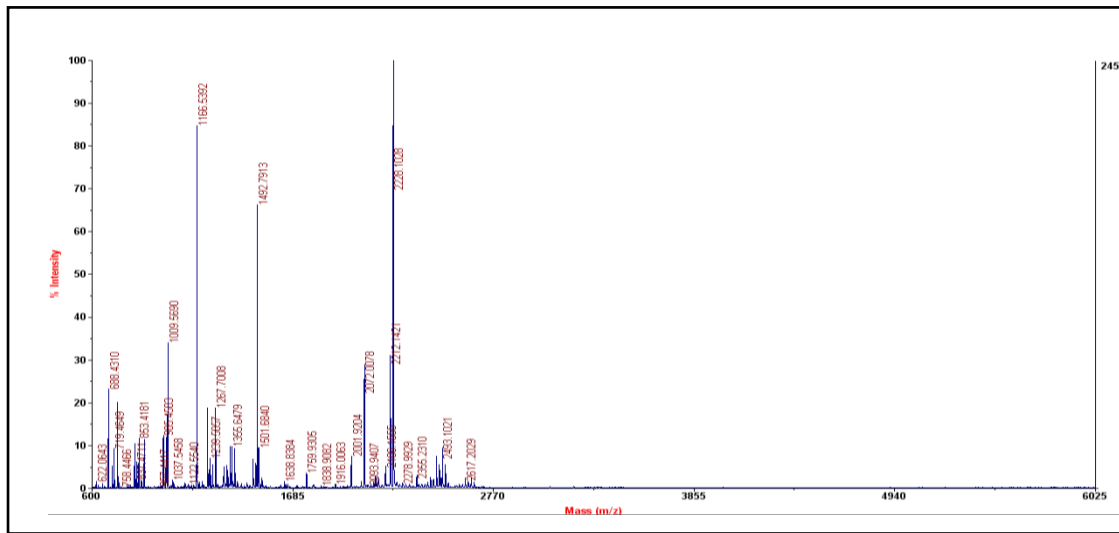


Figura.4: Análisis por Western Blot de la fracción purificada. Carril 1 marcador de masa molecular; carril 2: Fabp2 de la fracción final. La señal se reveló mediante la reacción de la fosfatasa alcalina.

El análisis por espectrometría de masas indicó que una de las bandas tenía un peso molecular de 15kDa mientras que la otra de 14,9 kDa. El tamaño teórico Fabp2 es de 15,060 kDa. El análisis de las masas obtenidas, empleando el motor de búsqueda MASCOT (www.matrixscience.com) indicó de manera estadísticamente significativa que la proteína de peso molecular de 15kDa presenta un 70% de cobertura con la proteína Fabp2 de *D. rerio*, mientras que la otra proteína presenta un 68% (Figuras 5 y 6).

A



B

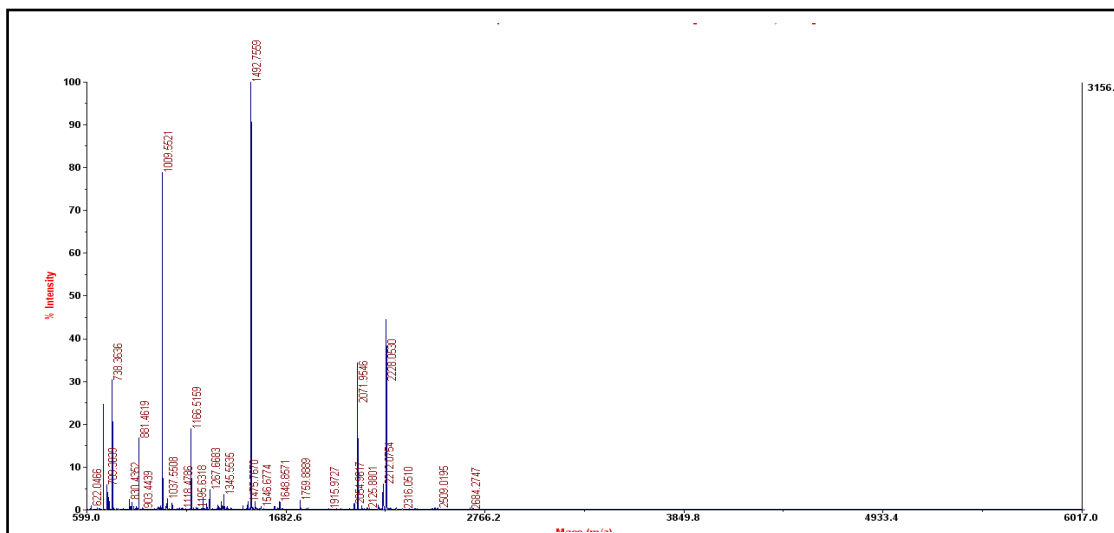


Figura 5: Espectro de masa de las dos proteínas analizadas. A) proteína de mayor masa molecular. B) proteína de menor masa molecular

A MTFN^{GTWKVDRNENYEKFMEQMGVNMV}KRKLA^{AHDNLKITLEQTGDKFNVKE}
VST^{FRTLEINFTLGVT}FDYSLADGTELTGS^{WVIEGDTLK}GT^{FTRKDNGKVL}T
TVRTIVNGELVQ^{SYSDGVEAKR}IFKRA

B MTFN^{GTWKVDRNENYEKFMEQMGVNMV}KRKLA^{AHDNLKITLEQTGDKFNVKE}
VST^{FRTLEINFTLGVT}FDYSLADGTELTGS^{WVIEGDTLK}GT^{FTRKDNGKVL}T
TVRTIVNGELVQ^{SYSDGVEAKR}IFKRA

Figura 6. Análisis por Mascot. Se indica en rojo los residuos que coinciden con la secuencia de Fabp2 de *D. rerio*. A) banda de mayor masa molecular; B) banda de menor masa molecular.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN PURIFICADA

Para cuantificar la fracción purificada se utilizó el método que utiliza el ácido bicinónico (BCA). Este método de cuantificación de proteínas se basa en la reducción del cobre por la proteína, en un medio alcalino (reacción de Biuret). La estructura macromolecular, el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina), son los responsables de dar inicio a esta reacción. El ion cuproso se une mediante la quelación con dos moléculas de BCA formando un complejo de color púrpura. Este complejo soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es casi lineal a la concentración proteica, en un amplio rango (20 a 2000 µg/ml). La tabla 1 muestra los valores de absorbancia obtenidos de las distintas diluciones de BSA (estándar) y de la fracción purificada. Con los valores mencionados se construyó la curva de calibración y se determinó la concentración de la fracción purificada aplicando la ecuación de la recta resultante (figura 7).

Tabla 1: Cuantificación de la fracción purificada. Valores de absorbancia a 562nm de diferentes diluciones de BSA **(A)** y de la fracción purificada **(B)**.

A

Concentración de BSA (µg/ml)	Absorbancia 562 nm	Promedio de absorbancia	Absorbancia-blanco
2000	2,1939	2,2574	2,049
	2,2929		
	2,2854		
1500	1,6996	1,7675	1,559
	1,8126		
	1,7903		
1000	1,1925	1,2185	1,011
	1,2788		
	1,1843		
750	0,9936	1,001	0,7926
	1,0204		
	0,9894		
500	0,7568	0,7481	0,5396
	0,7329		
	0,7546		
250	0,5572	0,5036	0,2951
	0,4698		
	0,484		
125	0,3385	0,3411	0,1326
	0,3441		
	0,3407		
25	0,2306	0,2423	0,0338
	0,2767		
	0,2198		
Blanco	0,2016	0,2085	
	0,2079		
	0,216		

B

Fracción purificada	Absorbancia 562 nm	Promedio de absorbancia	Absorbancia-blanco
Sin diluir	0,9254	0,9358	0,7333
	0,9586		
	0,9234		
Dilución 1/10	0,2482	0,2952	0,0927
	0,2979		
	0,3396		
Dilución 1/20	0,2404	0,2533	0,0508
	0,2598		
	0,2598		
Dilución 1/50	0,2283	0,2337	0,0252
	0,233		
	0,2399		
Dilución 1/100	0,2472	0,2287	0,0202
	0,2227		
	0,2347		

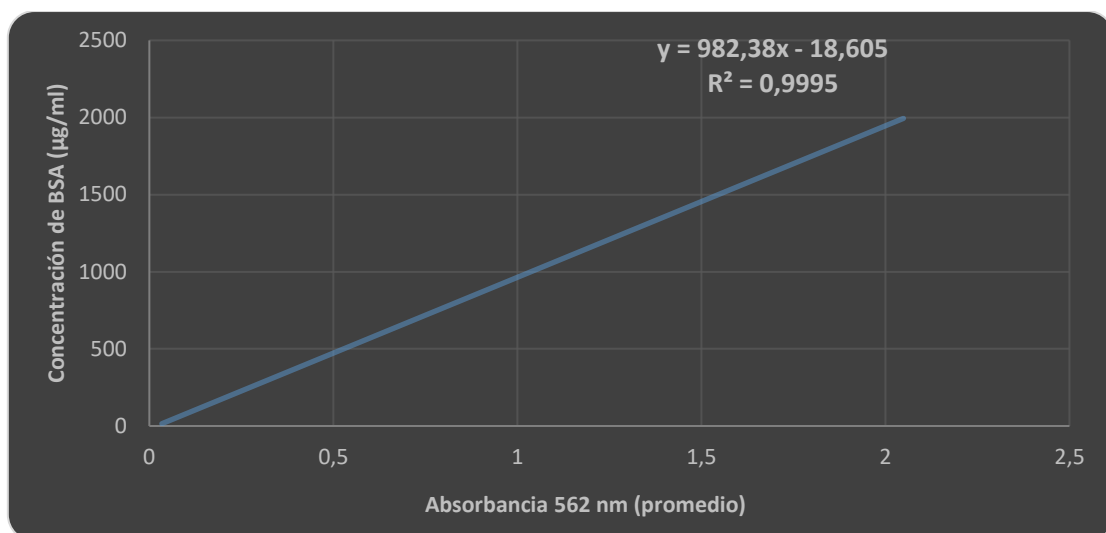


Figura 7: Curva estándar. Se indica la ecuación de la recta

Mediante la ecuación de la recta interpolamos el valor de absorbancia de la fracción purificada sin diluir para calcular la concentración de la misma. Resultando el valor de 701,77 µg/ml.

Para determinar la pureza de la proteína Fabp2 en la fracción purificada, realizamos una electroforesis de la misma tiñéndola con nitrato de plata (figura 8). Dicho gel fue escaneado mediante el software Fiji determinando la intensidad de cada banda. Se observaron siete bandas con diferente intensidad. En la tabla 2 se muestra el porcentaje obtenido para cada una. Determinamos que la pureza de Fabp2 es de 74,47 % (bandas 6 y 7). La concentración resultante de la Fabp2 purificada es de 522,6 µg/ml.

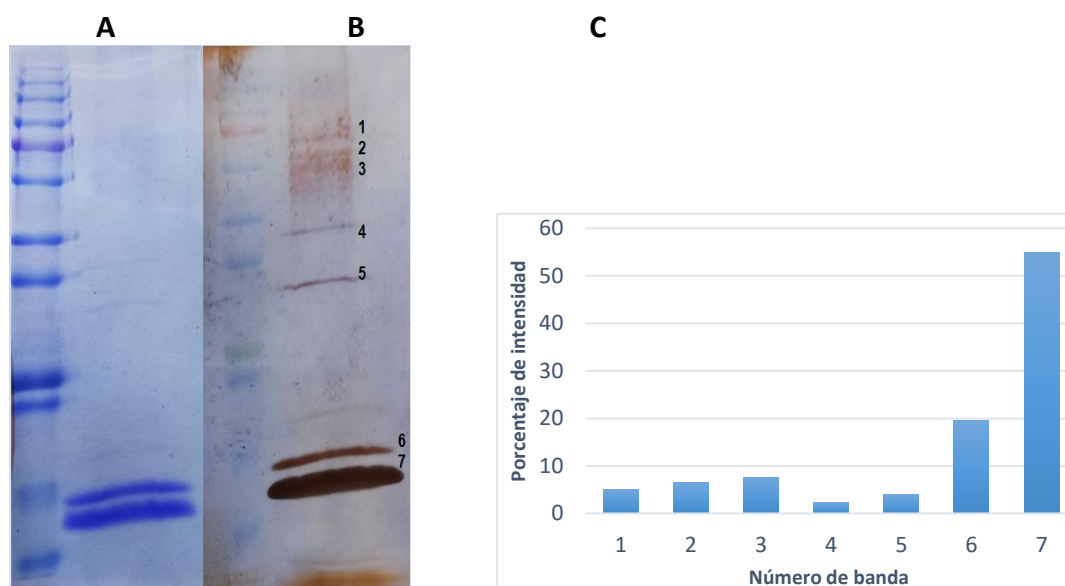


Figura 8: Evaluación de pureza. A) SDS- PAGE 15% de la fracción purificada teñido con Azul Coomassie B) SDS-PAGE de la fracción purificada teñida con nitrato de plata C) porcentaje de cada banda.

4.3. MODELADO POR HOMOLOGÍA

Para profundizar en la caracterización de esta proteína, iniciamos una serie de estudios *in silico*. Partiendo de la secuencia de la proteína Fabp2 de *D. rerio* reportada en el GenBank (AAH75970.1), y utilizando el servidor Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) realizamos un modelado por homología de la proteína (figura 9A). Se usó como molde la proteína recombinante FABP2 de *Rattus norvegicus* (1IFC_A.pdb). La imagen del modelo se obtuvo utilizando el programa RasMol. El alineamiento de ambas secuencias se muestra en la figura 9C.

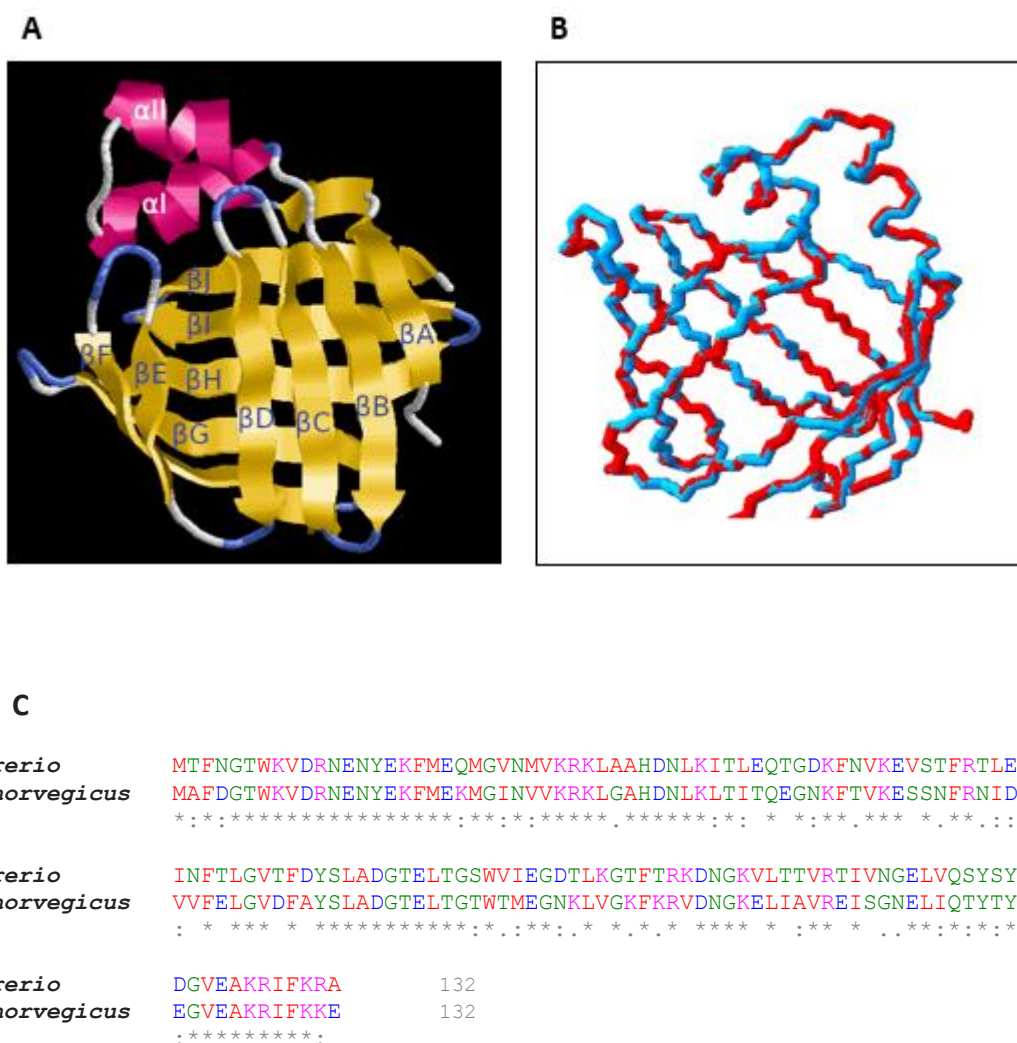


Figura 9: Modelo por homología de Fabp2 de *Danio rerio*. **A)** modelo de Fabp2. Se indican las dos alfa hélices como αI y αII y las 10 cadenas βn . **B)** Superposición del modelo con el molde, en azul se representa el modelo de Fabp2 y en rojo su molde. **C)** alineamiento de la secuencia de Fabp2 con la secuencia molde

En la figura 9C se puede apreciar un alto porcentaje de identidad entre ambas secuencias, 66,6%, y una similitud de 89,93%, reafirmando la pertenencia de la proteína de pez cebra a este subgrupo de proteínas. La superposición del modelo obtenido y el molde nos muestra también la identidad estructural sugiriendo una similitud funcional de nuestra proteína.

El servidor Swiss Model realiza una evaluación global del modelo, utilizando varios estimadores: GMQE y QMEANDisCo proporcionan una evaluación general del modelo asignando una puntuación entre 0 y 1; los valores más altos son indicadores de mayor calidad. El puntaje asignado a nuestro modelo fue de 0,8 y $0,82 \pm 0,07$ para cada

estimador respectivamente indicando una buena calidad al mismo. Los valores de QMEANDisCo resultan de comparar la desviación de la media cuadrática entre un set de modelos y estructuras proteicas.

La figura 10A muestra en forma gráfica la estimación generada por QMEANDisCo para cada residuo. Los residuos que muestran un valor menor a 0,6 indican una baja calidad. En la figura 10B se muestran los valores que el sistema de evaluación de Swiss Model llamado el QMEAN. Se indican 5 valores, que son la comparación de los parámetros estructurales con estructuras similares. Este valor nos indica los desvíos estándar del modelo con respecto a la media de un gran número de estructuras experimentales. En términos generales un valor menor a -4 indica una baja calidad de modelo. Esto se ejemplifica en el gráfico (figura 10C) en el que el eje x nos indica el número de residuos y el eje y el valor QMEAN. Cada punto representa la estructura de una proteína obtenida en forma experimental. Los puntos negros son estructuras con un desvío estándar de la media de 1, mientras que los gris muestran desvíos entre 1 y 2. La posición del modelo se indica en rojo.

A

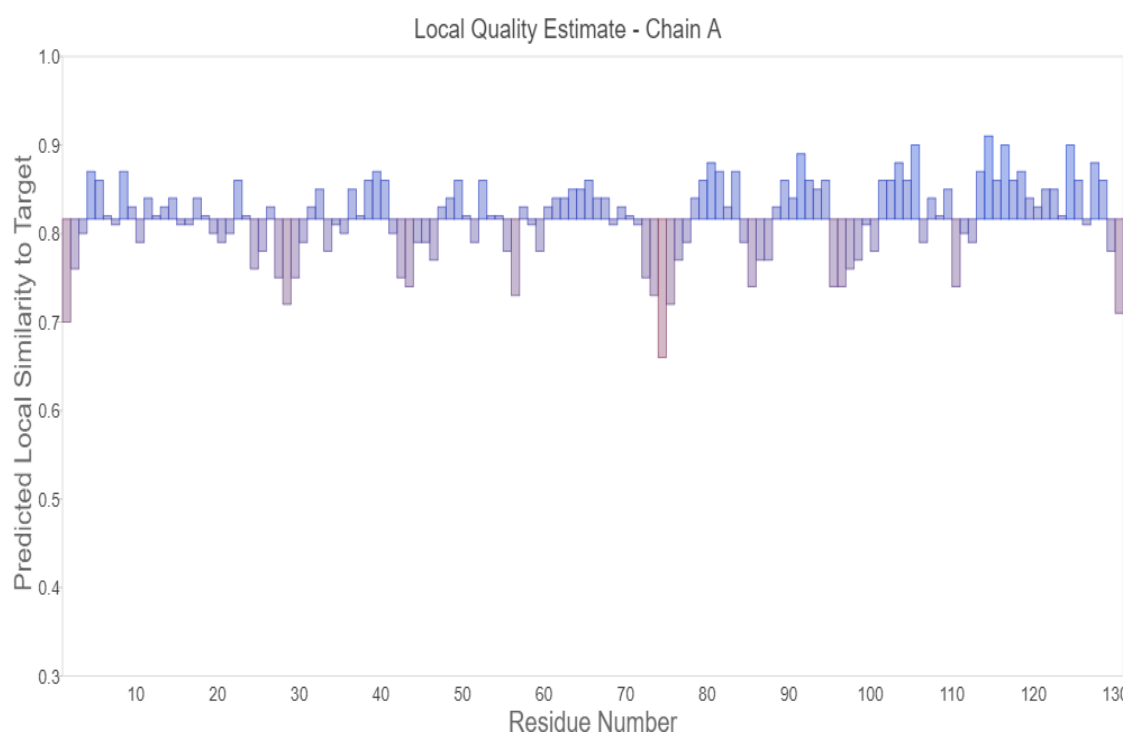
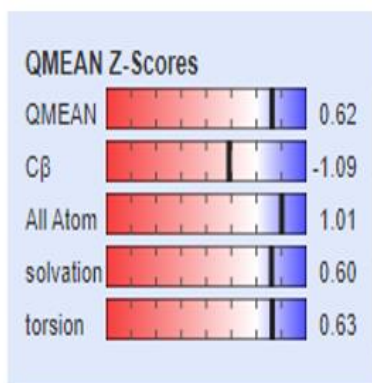
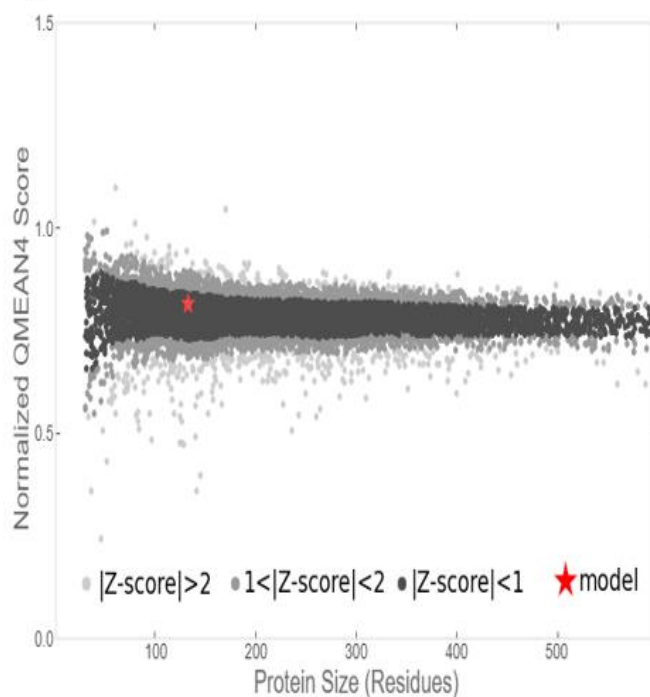


Figura 10: Evaluación de la calidad del modelo A) Gráfico de la calidad local del modelo; B) QMEAN Z-SCORE. C) Representación gráfica del QMEAN SCORE.

B**C**

Otra forma de evaluar la calidad de un modelo es a través del gráfico de Ramachandran. La figura 11 muestra el gráfico correspondiente a nuestro modelo y su molde. Este tipo de gráfico permite visualizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos diedros del esqueleto carbonado de una proteína. Así, nos permite determinar cuántos residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura secundaria determinado, y cuántos presentan unos ángulos de torsión forzados de acuerdo con la estructura de la proteína obtenida, de modo que cuanto mayor número de residuos presenten ángulos forzados, más probable será que la estructura de la proteína no sea la más adecuada. Los aminoácidos que forman las estructuras α dextrógiras, α levógiras y β de la proteína caen en las zonas energéticamente permitidas. Los aminoácidos que están fuera de las zonas energéticamente permitidas son en general glicinas, debido al pequeño tamaño de su grupo R permitiéndoles adoptar muchas conformaciones estéricamente prohibidas para otros aminoácidos.

Como puede observarse en la figura 11 prácticamente la totalidad de los residuos tanto del modelo como del molde caen dentro de las regiones permitidas, indicando también la buena calidad del modelo. Los residuos que caen en regiones no permitidas

sin contar las Glicinas son: His 34 (φ -122,56; ψ 40,29), Thr 44 (φ -135,42; ψ -86,61) y Asn 111 (φ -59,82; ψ -114,86). La His 34 se encuentra en el loop que une la $\alpha 2$ con la cadena βB ; la Thr 44 se encuentra en la cadena $\beta 2$ próxima al bucle de $\beta 3$ correspondiente; la Asn 111 se ubica en el bucle entre la βH y βI ; Estas posiciones podrían explicar la localización en zonas poco permitidas

Presentan ángulos propios de hélices α levógiros los residuos Asn 14 (φ 61,99; ψ -18,01), Asn 36 (φ -60,61; ψ -31,02), Asp 121 (φ -47,24; ψ -42,56). La Asn 14 se ubica próxima al comienzo de la hélice $\alpha 1$; la Asn 36 se ubica al comienzo de la hebra βB y el Asp 121 se encuentra en el loop que conecta las hebras βI y βJ . La Thr 44 y el Asp 121 no están conservadas en el molde.

En suma, el modelo obtenido representa muy bien la estructura de la proteína Fabp2 de *D. rerio*.

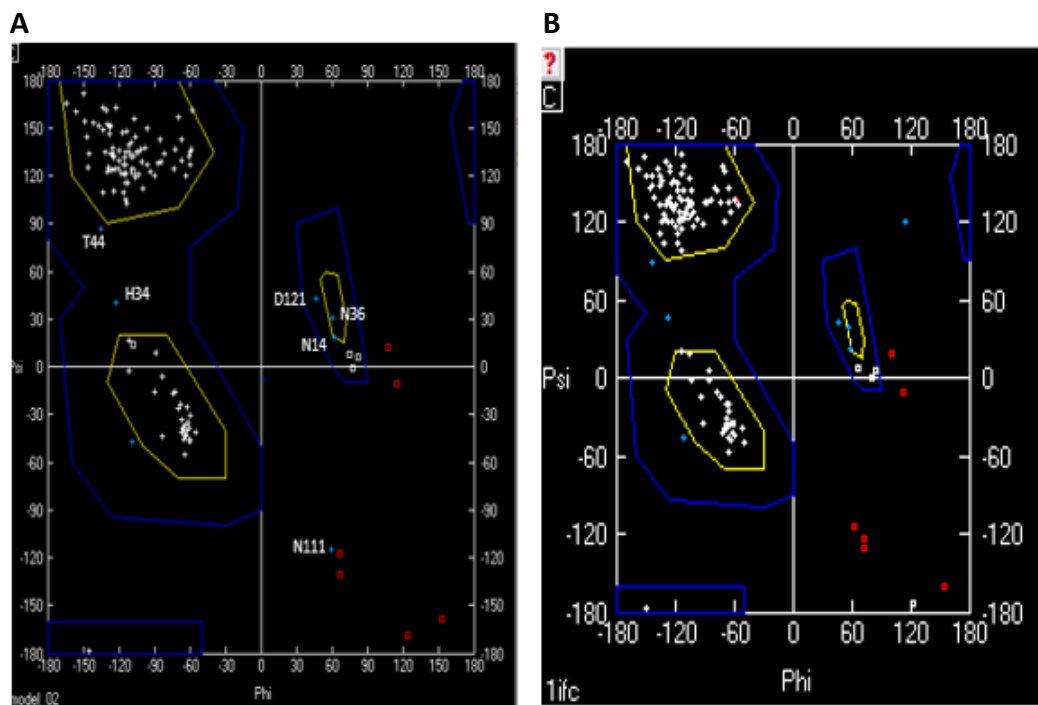


Figura 11: Gráfico de RAMACHANDRAN del modelo. (A) modelo de Fabp2 (B) molde (1ifc). Se indican los aminoácidos ubicados en zonas no permitidas (en rojo y en azul).

Con el objetivo de inferir posibles funciones de la proteína de *D. rerio* se llevó a cabo el alineamiento de Fabp2 con proteínas del mismo subgrupo de FABPs, de organismos representativos del subfilo vertebrados (figura 12). Se puede apreciar la alta

conservación de aminoácidos entre las distintas proteínas analizadas, indicando que podrían estar relacionadas desde el punto de vista evolutivo y funcional. Se puede observar que están presentes en *D. rerio* los residuos Trp 83 la Arg 107 y la Gln 116, involucrados en la unión al ligando y la Phe 57 que integra la región portal (Eads et al., 1993).



Figura 12: Alineamiento de secuencias de FABP2 de distintos miembros de vertebrados. Se indica con sombreado en amarillo los aminoácidos críticos en la unión del ligando y la Phe de la región portal. Para el alineamiento se utilizaron las secuencias de: *Danio rerio* (AAH75970.1); *Homo sapiens* (AAH69617.1); *Xenopus tropicalis* (AAI35506.1); *Crocodylus porosus* (XP_019389865.1); *Gallus gallus* (NP_001007924.1). Los asteriscos (*) señalan los aminoácidos 100% conservados; el símbolo de dos puntos (:) señala que hubo un cambio de un aminoácido por otro con propiedades muy similares; el símbolo de un punto (.) señala que hay un cambio de un aminoácido por otro con propiedades débilmente similares.

Cuando analizamos los miembros de toda la familia de las FABPs tomando como ejemplo *Homo sapiens* observamos una identidad variable a nivel de su estructura primaria (entre un 20 y un 70%) (figura 13). A pesar de esta característica, los distintos miembros de la familia de las FABPs, poseen una región relativamente conservada en la región N-terminal. Puede observarse que los aminoácidos involucrados en la unión del ligando de las FABPs intestinales como el Trp 83 y Gln 116 no están presentes en los demás miembros de la familia. Mientras que la Arg 107 está presentes en la mayoría de ellos.

Están conservados en todos los miembros de la familia, los aminoácidos: Met 19, las Gly 23, 45, 66 y la Arg 127. La Metionina y las Glicinas podrían tener una función estructural en los distintos miembros de la familia de las FABPs. Estos aminoácidos

también se conservan en Fabp2 de *D. rerio* (ver figura 12). En varios miembros la Arginina 127 y la Arg 107 participan en la unión al ligando.

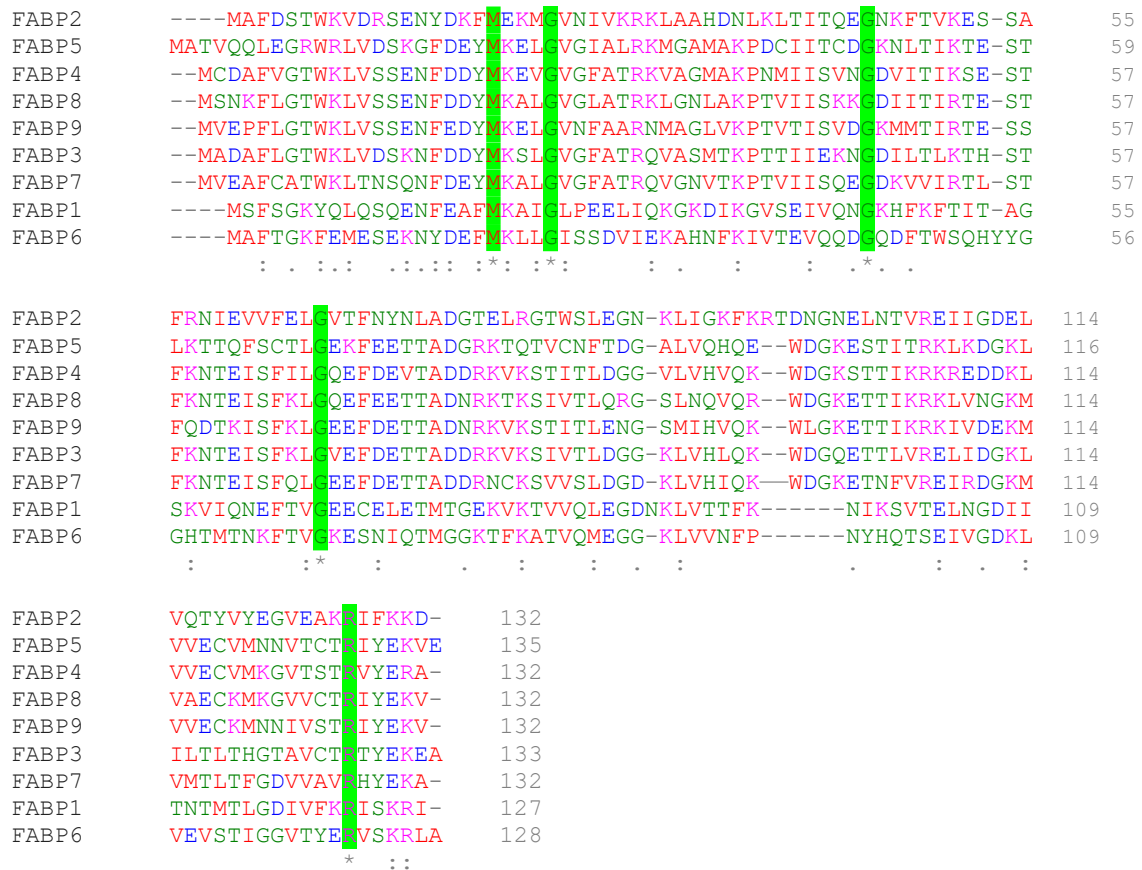


Figura 13: Alineamiento de las distintas FABPs humanas. Se marcan en verde los aminoácidos 100% conservados. FABP1 (NP_001434.1); FABP2 (AAH69617.1); FABP3 (CAG33148.1); FABP4 (CAG33184.1); FABP5 (NP_001435.1); FABP6 (AAH22489.1); FABP7 (CAG33338.1); FABP8 (NP_002668.1); FABP9 (NP_001073995.1). Los asteriscos (*) señalan los aminoácidos 100% conservados; el símbolo de dos puntos (:) señala que hubo un cambio de un aminoácido por otro con propiedades muy similares; el símbolo de un punto (.) señala que hay un cambio de un aminoácido por otro con propiedades débilmente similares.

4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para detectar la localización de Fabp2 en el intestino anterior de peces adultos *D. rerio*, se realizaron estudios de inmnohistoquímica sobre cortes conservados en parafina. Se usó un anticuerpo monoclonal específico contra FABP2 y como anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594. Para la tinción de los núcleos se usó DAPI. La siguiente imagen muestra un corte histológico de intestino anterior de un pez adulto de *D. rerio*. Se puede apreciar claramente la presencia de Fabp2 (en verde) a lo

largo de toda la vellosidad (Figura 14A) así como en el citoplasma y en algunos núcleos de los enterocitos. (Figura 14).

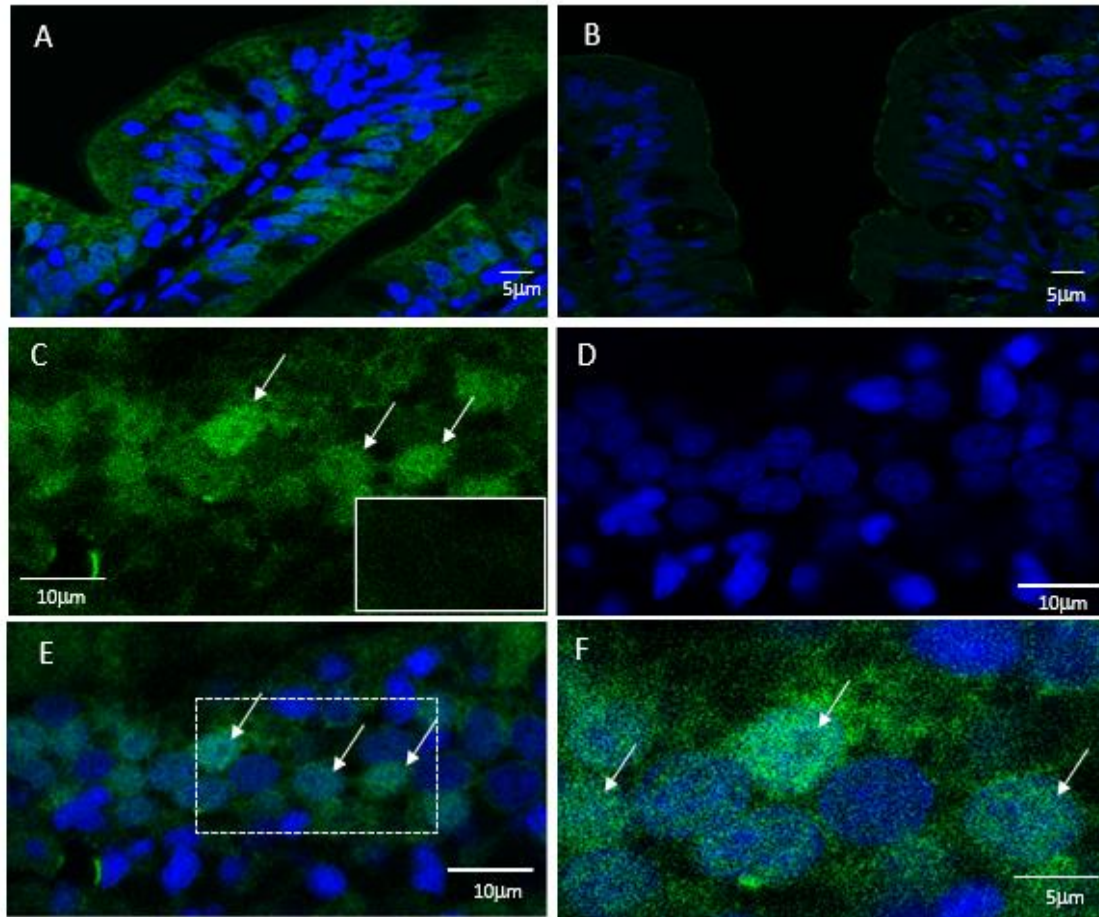


Figura 14: Inmunolocalización de Fabp2 en el intestino de *D. rerio* adulto. Sección histológica teñida con anticuerpo monoclonal anti-Fabp2 y anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 594 (verde) (A,C,E,F). Las secciones se contratiñieron con DAPI (azul). A: Sección de vellosidad intestinal, B: control negativo. Sección a mayor aumento mostrando la señal de Fabp2 (C), los núcleos (D), superposición E. F: sección indicada, en E con mayor aumento. Insertado en C control negativo. La flecha indica núcleos con marcación de Fabp2

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la caracterización de la proteína Fabp2 recombinante de *D. rerio* aplicando técnicas básicas empleadas en el área de la Bioquímica, la Biología Molecular y la Bioinformática.

Partimos de un stock en glicerol de la proteína recombinante Fabp2 clonada en un vector de expresión. Se expresó en medio líquido y se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular. El análisis por electroforesis mostró dos bandas de peso molecular muy similar al esperado. Para determinar cuál de las dos bandas correspondía a la proteína esperada se realizó *Western Blot* empleando un anticuerpo específico y espectrometría de masas. Tanto el *Western Blot* como el análisis por espectrometría de masas corroboró que ambas bandas corresponden a Fabp2.

Nos surgió la duda sobre la causa de la variación de sus pesos moleculares; suponíamos en un principio que podía deberse a una traducción incompleta de la proteína, por lo que podrían faltar aminoácidos en el extremo C-terminal. Por otro lado, los análisis por MASCOT mostraron como única diferencia, que la proteína de mayor peso molecular tenía el péptido MTFNGTWK mientras que la otra detectó un péptido TFNGTWK en el que puede observarse que difieren en la metionina inicial. Las diferencias de peso molecular podrían corresponder a la masa molecular de la Metionina. No encontramos otra explicación para este resultado. Fenómenos de este tipo no se habían observado anteriormente al purificar esta proteína, pero sí al purificar otras proteínas de la familia de otros organismos por ejemplo del cestode *Mesocostoides corti* (Alvite, 2014).

Para analizar la pureza de la fracción purificada realizamos una SDS-PAGE con tinción con nitrato de plata en la que pudimos observar algunas bandas tenues correspondientes a contaminantes que no se observaban en la tinción con Azul

Coomassie. Una vez escaneado el gel determinamos una pureza de 74,47% siendo la concentración de 522,6 µg/ml y un rendimiento de la purificación de 12,5 mg/litro de cultivo. Este valor es algo inferior al obtenido en otras oportunidades por el grupo de investigación (Suárez, 2018; Canclini, 2010).

Se realizaron estudios *in silico* para obtener el modelo tridimensional de la proteína en estudio y comparar su secuencia con otros miembros de la familia de proteínas a la que pertenece. Se empleó el servidor Swiss Model para diseñar un modelo por homología de la proteína Fabp2 del pez cebra, tomando como molde la proteína FABP2 de *Rattus norvegicus*. Mediante el modelo construido, se pudo analizar su estructura, la distribución espacial de sus aminoácidos, y compararlo con el molde. Tanto el análisis que emplea el propio servidor como la superposición con el molde indicó que el modelo era satisfactorio. Los residuos fundamentales para la unión con el ligando como los que conforman el portal mantenían las posiciones esperadas. Los residuos que caían en posiciones desfavorables según el gráfico de Ramachandran coincidían con los del molde, indicando también que el modelo se ajustó al molde satisfactoriamente.

Se comparó la secuencia de la proteína de *D. rerio* con las homólogas intestinales de miembros representativos de los vertebrados, así como con todos los miembros de la familia de las FABPs tomando como ejemplo el *Homo sapiens*. En el primer caso se analizó similitudes entre los residuos aminoacídicos que permitieron inferir posibles efectos tanto en estructura como en función. Por ejemplo se pudo observar que Fabp2 del pez cebra mantenía los residuos Trp 83, Arg 107 Gln 116 fundamentales para la unión del ácido graso en las formas intestinales de la familia (Eads et al., 1993).

La comparación con todos los miembros humanos de la familia de las FABPs permitió establecer que los residuos 100% conservados en todos ellos también están en la proteína en estudio. Por otro lado, destacamos un bajo porcentaje de identidad (entre un 20 y un 70%) entre los distintos miembros de la familia.

La determinación de la localización de la proteína en el intestino del pez adulto mediante inmunohistoquímica, permitió verificar una amplia distribución citoplasmática, así como nuclear. La localización nuclear reafirma observaciones de

trabajos anteriores (Esteves et al., 2016). Este hallazgo nos genera una gran interrogante respecto al mecanismo de transporte de Fabp2 al núcleo del enterocito. Las proteínas ingresan al núcleo mediante una secuencia señal de localización nuclear (NLS) reconocida por las importinas o mediante difusión pasiva (Adam y Gerace, 1991; Adam y Adam, 1994; Gorlich et al., 1994; Moroianu et al., 1995). El tamaño de las FABPs es suficiente para que ingresen a través del poro nuclear sin necesidad de un transportador. Sin embargo, se ha reportado que existen en algunas de las proteínas de la familia una señal de localización nuclear tridimensional (Gillilan *et al.*, 2008). En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se pudo descifrar una secuencia tridimensional de traslocación nuclear en la proteína Fabp2 de *D. rerio*, compuesta por los aminoácidos Lys17, Arg 29 y Lys 30 (Suárez et al., 2020). Esta secuencia se mantiene conservada en la FABP2 de los vertebrados, pero no en todas las FABPs de la familia, lo que podría indicar un mecanismo específico de este grupo. En el mismo trabajo se demostró que Fabp2 no ingresa por el sistema de importinas, por lo que queda abierta la pregunta de cuál es el mecanismo molecular que permite la detección de la NLS de la proteína y su posterior transporte hacia el núcleo.

En conclusión, el presente trabajo resume la caracterización de Fabp2 de *Danio rerio*, paso fundamental y necesario para poder comprender la función/es de la proteína *in vivo*. Un gran cuerpo de evidencia demuestra que el pez cebra puede servir como un "vertebrado canónico" no sólo en biología del desarrollo sino también en el estudio del metabolismo y de enfermedades humanas (Seth *et al.*, 2013, Santoro *et al.*, 2014, Astone *et al.*, 2017; Yoganantharjah et Gibert, 2017; Danilova *et al.*, 2018; Völkel *et al.*, 2018). En este sentido encontrar que la proteína intestinal de *D. rerio* tiene aminoácidos fundamentales para la unión de ligando, en una posición conservada, así como aminoácidos que son críticos para la estructura y función de estas proteínas, permite emplear a Fabp2 del pez cebra como candidato para este tipo de estudios.

Para finalizar, este trabajo me ha permitido familiarizarme con variadas técnicas vinculadas al estudio de proteínas, en este caso relacionadas a los primeras etapas de la caracterización de Fabp2; conocimiento que ha sido de gran aporte e importancia para mi formación académica; soy muy consciente que este conocimiento adquirido es recién el inicio para seguir perfeccionándome y volverme más idóneo en diferentes técnicas de laboratorio, paso crucial para poder realizar futuros aportes al campo de la ciencia.

5.1 PERSPECTIVAS

La purificación y conservación de Fabp2 de *Danio rerio* es un paso crucial para poder contar con un stock de la proteína en estudio y utilizarla en trabajos futuros.

Muchas son las preguntas abiertas que aún se mantienen con respecto a estas proteínas. Por ejemplo, una vez dentro del núcleo comprender su interacción con los distintos dominios nucleares, y cómo participa en el metabolismo lipídico. Al respecto, se ha propuesto que distintos tipos de FABPs podrían interaccionar con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) cediéndoles su ligando y así activándolos (Hostetler et al., 2009; McIntosh et al., 2013; Babeu y Boudreau, 2014). En este sentido, resulta de interés determinar cuáles son los genes blanco que estarían activando o inhibiendo su expresión. El efecto de la dieta sobre la expresión de esta proteína es también un tema interesante a resolver. En trabajos previos del grupo de investigación se determinó un aumento de la expresión génica en respuesta a la ingesta (Esteves et al., 2016; Suárez, 2018). Estas son algunas de las líneas que sigue nuestro grupo de investigación para así continuar con el estudio de la función de Fabp2. Pensamos que los conocimientos obtenidos podrían generar terapias o tratamientos nuevos contra distintas enfermedades involucradas en el metabolismo lipídico como es por ejemplo la obesidad, enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo produciendo grandes costos económicos a los distintos países.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adam SA y Gerace L. (1991). Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell*. 66, 837–847.

Adam EJ y Adam SA. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 125, 547–555.

Alvite, G. (2014). FABPs de cestodos: interacciones y destinos, Facultad de Ciencias. PEDECIBA Biología.

Alpers, D. H., Bass, N. M., Engle, M. J., & Deschryver-Kecskemeti, K. (2000). Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(3), 352–362. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00200-0)

Astone, M., Dankert, E.N., Alam, S.K. et al. Fishing for cures: The allURE of using zebrafish to develop precision oncology therapies. *npj Precision Onc* 1,39 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0043-9>

Babeu JP, Boudreau F. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol*. 20, 22–30.

Baier, L. J., Sacchettini, J. C., Knowler, W. C., Eads, J. et al. (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 95(3), 1281–1287. <https://doi.org/10.1172/JCI117778>

Bambino, K., Zhang, C., Austin, C., Amarasiriwardena, C. et al. (2018). Inorganic arsenic causes fatty liver and interacts with ethanol to cause alcoholic liver disease in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 11(2). <https://doi.org/10.1242/DMM.031575>

Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D. et al (1994). Lipid-binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 89–151.

Bass, N. M. (1988). The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Aspects of Structure, Regulation, and Function. *International Review of Cytology*, 111(C), 143–184. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61733-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61733-7)

Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertz, A. V., & Banaszak, L. J. (1997). Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 277-303.

Besnard P, Niot I, Poirier H, Clément L, Bernard A (2002) New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol Cell Biochem* 239(1–2):139–147. <https://doi.org/10.1023/A:1020505512364>

Canclini L. (2010). “Generación de herramientas moleculares para el estudio de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) del enterocito de *Danio rerio*”. Tesis de Maestría PEDECIBA.

Chiu, H. J., Bakolitsa, C., Skerra, A., Lomize, A. et al. (2010). Structure of the first representative of Pfam family PF09410 (DUF2006) reveals a structural signature of the calycin superfamily that suggests a role in lipid metabolism. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(10), 1153–1159. <https://doi.org/10.1107/S1744309109037749>

Danilova, N., Wilkes, M., Bibikova, E. et al. Innate immune system activation in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan Anemia. *Sci Rep* 8, 5165 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23561-6>

DeRossi, C., Vacaru, A., Rafiq, R., Cinaroglu, A. et al (2016). Trappc11 is required for protein glycosylation in zebrafish and humans. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), 1220–1234. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0557>

Eads, J., Sacchettini, J. C., Kromminga, A., & Gordon, J. I. (1993). Escherichia coli-derived rat intestinal fatty acid binding protein with bound myristate at 1.5 Å resolution and I-FABP(Arg106→Gln) with bound oleate at 1.74 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26375–26385. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74325-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74325-7)

Esteves, A., & Ehrlich, R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 142(3-4 SPEC. ISS.), 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.006>

Esteves, A., Knoll-Gellida, A., Canclini, L., Silvarrey, M. C., André, M., & Babin, P. J. (2016). Fatty acid binding proteins have the potential to channel dietary fatty acids into enterocyte nuclei. *Journal of Lipid Research*, 57(2), 219–232. <https://doi.org/10.1194/jlr.M062232>

Faillaci, F., Milosa, F., Critelli, R. M., Turola, E., Schepis, F., & Villa, E. (2018). Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(4), 255–265. <https://doi.org/10.1002/ame2.12042>

Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 9–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5)

Franchini, G. R., Storch, J., & Corsico, B. (2008). The integrity of the α -helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(4), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.01.005>

Friedman R, Nachliel E, Gutman M. (2006). Fatty acid binding proteins: same structure but different binding mechanisms? Molecular dynamics simulations of intestinal fatty acid binding protein. *Biophys J*;90:1535–45

Glatz, J. F. C., Van Nieuwenhoven, F. A., Luiken, J. J. F. P., Schaap, F. G., & Van Der Vusse, G. J. (1997). Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57(4–5), 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(97\)90413-0](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(97)90413-0)

Glatz JFC, Veerkamp JH. (1985). Intracellular fatty acid-binding proteins. *Int JBiochem*. 17, 13-22.

Gillilan RE, Ayers SD, Noy N. (2007). Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *J Mol Biol*. 372(5):1246-60.

Gordon JI, Lowe JB. (1985). Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. *Chem Phys Lipids*. 38, 137-158.

Gorlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*. 79, 767–778.

Halldén, G., & Aponte, G. W. (1997). Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12591–12600. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12591>

Hauerland, N. H., & Spener, F. (2004). Fatty acid-binding proteins - Insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research*, 43(4), 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.001>

Hostetler, H. A., McIntosh, A. L., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Payne, H. R., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR α in cultured primary hepatocytes. *Journal of Lipid Research*, 50(8), 1663–1675. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900058-JLR200>

Hsu, K. T., & Storch, J. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13317–13323. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13317>

Jones, T. A., Bergfors, T., Sedzik, J., & Unge, T. (1988). The three-dimensional structure of P2 myelin protein. *The EMBO Journal*, 7(6), 1597–1604. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02985.x>

Lagakos, W. S., Gajda, A. M., Agellon, L., Binas, B., Choi, V., Mandap, B. et al (2011). Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), 803–815. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00229.2010>

Lai MP, Katz FS, Bernard C, Storch J, Stark RE. 2020. Two fatty acid-binding proteins expressed in the intestine interact differently with endocannabinoids. *Protein Sci.*29(7):1606-1617.

Levy, E., Ménard, D., Delvin, E., Montoudis, A. et al. (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochemistry and Cell Biology*, 132(3), 351–367. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0608-y>

Li, X., Xue, Y., Pang, L., Len, B., Lin, Z., Huang, J., ShangGuan, Z., & Pan, Y. (2019). Agaricus bisporus-derived β -glucan prevents obesity through PPAR γ downregulation and autophagy induction in zebrafish fed by chicken egg yolk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.122>

Lücke C, Rademacher M, Zimmerman AW, van Moerkerk HT, Veerkamp JH, Rüterjans H. Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). *Biochem J.* 2001;354:259–66.

Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honoré B, Celis JE. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol.* 1992 Sep;99(3):299-305. doi: 10.1111/1523-1747.ep12616641. PMID: 1512466.

McIntosh, A. L., Petrescu, A. D., Hostetler, H. A., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2013). Liver-type fatty acid binding protein interacts with hepatocyte nuclear factor 4 α . *FEBS Letters*, 587(23), 3787–3791. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.043>

Montoudis, A., Seidman, E., Boudreau, F., Beaulieu, J. F., Menard, D., Elchebly, M., Mailhot, G., Sane, A. T., Lambert, M., Delvin, E., & Levy, E. (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion β -oxidation and cholesterol uptake. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 961–972. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700363-JLR200>

Moroianu J, Blobel G, Radu A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks importsubstrate at nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 2008–2011.

Ockner, R. K., J. A. Manning, R. B. Poppenhausen, and W. K. L. Ho, 1972. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 177:56—58

Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N., and Tanaka, T. (2010) Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiology*. 10:21.

Ragona L, Pagano K, Tomaselli S, Favretto F, Ceccon A, Zanzoni S, et al. The role of dynamics in modulating ligand exchange in intracellular lipid binding proteins. Biochim Biophys Acta. 2014;1844:1268–78.

Santoro MM. (2014). Zebrafish as a model to explore cell metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 546-54.

Seth, A., Stemple, D. L., & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(5), 1080–1088. <https://doi.org/10.1242/dmm.011346>

Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H, Nakamura Y, Fujiwara T. (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochemica et Biophysica Acta.* 1354, 24-28.

Simpson MA, Bernlohr DA. Analysis of a series of phenylalanine 57 mutants of the adipocyte lipid-binding protein. *Biochemistry*. 1998;37:10980–6.

Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*. 2011 Mar;5(3):170-91. doi: 10.1186/1479-7364-5-3-170. PMID: 21504868; PMCID: PMC3500171

Stan, S., Lambert, M., Delvin, E., Paradis, G., O’Loughlin, J., Hanley, J. A., & Levy, E. (2005). Intestinal fatty acid binding protein and microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms in French-Canadian youth. *Journal of Lipid Research*, 46(2), 320–327. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400346-JLR200>

Storch, J., & Corsico, B. (2008). The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid–Binding Proteins. *Annual Review of Nutrition*, 28(1), 73–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093710>

Storch, J., & Thumser, A. E. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32679–32683. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.135210>

Storch, J., & McDermott, L. (2008). Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *Journal of Lipid Research*, 50(SUPPL.). <https://doi.org/10.1194/jlr.R800084-JLR200>

Suárez, M. (2018). Rol de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos en el núcleo del enterocito. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Uruguay.

Suárez, M., Canclini, L., & Esteves, A. (2020). Identification of a non-classical three-dimensional nuclear localization signal in the intestinal fatty acid binding protein. *PLoS ONE*, 15(11 November), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242312>

Tsai, I. T., Wu, C. C., Hung, W. C., Lee, T. L., Hsuan, C. F., Wei, C. T., Lu, Y. C., Yu, T. H., Chung, F. M., Lee, Y. J., & Wang, C. P. (2020). FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy. *International journal of medical sciences*, 17(15), 2338–2345. <https://doi.org/10.7150/ijms.49078>

Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J*. 14, 2040–2046

Venkatachalam AB, Parmar MB, Wright JM. Evolution of the duplicated intracellular lipid-binding protein genes of teleost fishes. *Mol Genet Genomics*. 2017

Aug;292(4):699-727. doi: 10.1007/s00438-017-1313-5. Epub 2017 Apr 7. PMID: 28389698.

Vogel Hertz, A., & Bernlohr, D. A. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(5), 175–180. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00257-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00257-5)

Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO. (2018). The zebrafish model in oncology. *Med Sci*. 34, 345-353

Wang M, Liu YE, Goldberg ID, Shi YE. (2003). Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid-binding protein MRG. *J Biol Chem*. 278, 47319-47325.

Xu H, Diolintzi A, Storch J. 2019. Fatty acid-binding proteins: functional understanding and diagnostic implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 22(6):407-412.

Yang Y, Spitzer E, Kenney N, Zschiesche W, Li M, Kromminga A, Muller T, Spener F, et al. (1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J Cell Biol*. 127, 1097-109.

Yoganantharajah P, Gibert Y. (2017). The Use of the Zebrafish Model to Aid in Drug Discovery and Target Validation. *Curr Top Med Chem*. 17, 2041-2055.

Zhao X, Pack M. (2017). Modeling intestinal disorders using zebrafish. *Methods Cell Biol*. 138, 241-270.

Zhao, Y., Cao, X., Fu, L., & Gao, J. (2020). n-3 PUFA reduction caused by fabp2 deletion interferes with triacylglycerol metabolism and cholesterol homeostasis in fish. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2149–2161. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10366-9>